

UNTERSUCHUNGEN
ZUR NATUR UND REAKTIONSWEISE DES
RHEUMAFAKTORS UND DER INHIBITOREN

Habilitationsschrift

von

Dr. Hartwig Mathies

1964

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Natur und Reaktionsweise des
Rheumafaktors und der Inhibitoren

als Habilitationsschrift
zur Erlangung der *venia legendi*
und Ernennung zum Privatdozenten
in der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. Hartwig Mathies
München 1964



Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	4
Historischer Überblick über die Entdeckung des Rheumafaktors und die Entwicklung seiner Nachweismethoden	4
Historischer Überblick über die Inhibitionsreaktionen	8
Reaktionsweise und Natur des Rheumafaktors	10
Reaktionen des Rheumafaktors in verschiedenen Systemen	10
Gammaglobulin-Aggregate als Reaktant	11
Rheumafaktoraktivität in verschiedenen Serumfraktionen	14
Lokalisation des Rheumafaktors im Proteinspektrum mit serologischen und immunologischen Methoden	16
Charakterisierung des Rheumafaktors durch Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge und Bedeutung der hierbei gefundenen löslichen Komplexe	19
Heterogenität des Rheumafaktors	22
Anti-Gammaglobulin-Faktoren bei anderen Erkrankungen und bei Gesunden	24
Zur Frage der Antikörpernatur des Rheumafaktors	27
Zur Frage der Komplementnatur des Rheumafaktors	31
Inhibitoren der Rheumafaktor-Reaktionen	32
Hitzelabile Inhibitoren	32
Hitzestabile Inhibitoren	35
 <u>Eigene Untersuchungen</u>	 39
1) Untersuchungen über die Thermostabilität von Rheumafaktor und Reaktant	39
2) Untersuchungen von Vollserum und Serumfraktionen mit dem Latex-Agglutinationstest	43
3) Entwicklung einer Methode zur Isolierung des Rheumafaktors	52
4) Gewinnung eines Rheumafaktor-Antiserums	59
5) Immunologische Untersuchungen mit Rheumatikerserum, isoliertem Rheumafaktor und Antirheumafaktorserum	60

6) Untersuchungen über die Reaktionsweise der Inhibitoren	104
<u>Diskussion</u>	135
<u>Zusammenfassung</u>	144
<u>Literaturverzeichnis</u>	146

E i n l e i t u n g

Es wird im Folgenden darauf hinzuweisen sein, daß der bei chronischer Polyarthrititis nachweisbare Rheumafaktor kein exakt definierbares Protein darstellt, sondern eine Heterogenität aufweist. Diese Erkenntnis führte dazu, von Rheumafaktoren statt von einem Rheumafaktor zu sprechen. Daneben finden sich auch bei anderen Erkrankungen in ähnlicher Weise reagierende Faktoren, die wiederum einige Besonderheiten aufweisen. Es wurde deshalb vorgeschlagen, diese Faktoren einschließlich der Rheumafaktoren entsprechend ihrer gemeinsamen Eigenschaft, mit γ -Globulin zu reagieren, als Anti-Gammaglobulin-Faktoren zusammenzufassen⁶⁷. Wir werden dennoch, entsprechend dem Thema dieser Arbeit und nach der noch allgemein gültigen Nomenklatur in der allgemeinen Erörterung des Problems den Begriff des Rheumafaktors vorerst beibehalten und eine differenzierende Terminologie nur anwenden, wenn diesbezügliche Fragestellungen zu diskutieren sind.

Historischer Überblick über die Entdeckung des Rheumafaktors und die Entwicklung seiner Nachweismethoden

Die Geschichte der Antigammaglobuline, zu denen der sogenannte Rheumafaktor (im anglo-amerikanischen Schrifttum: Rheumatoid Arthritis Factor) zu zählen ist, geht wohl auf die Beobachtung M e y e r 's (1922)⁸⁷ zurück, daß manche Seren eine erhebliche agglutinationsfördernde Wirkung bei Durchführung der Wassermann'schen Reaktion aufwiesen. Die agglutinationsfördernde Substanz wird nicht von nativen, dagegen von sensibilisierten Hammelblutkörperchen gebunden. Auch trat die Agglutinationswirkung nur bei sensibilisierten Erythrocyten ein. Eine Erwärmung auf 56°C beeinflusste den Faktor nicht, er wurde jedoch durch halbstündiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die Diagnosen zweier eingehend untersuchter Fälle lauteten "Lebercirrhose" und "chronische Bronchitis". Ein Zusammenhang der Erscheinung mit der chronischen Polyarthrititis wurde noch nicht gesehen.

Erst 1940 findet sich bei W a a l e r¹⁴⁵ eine Fortsetzung der Untersuchungen, jetzt besonders im Hinblick auf Seren von Patienten

mit chronischer Polyarthrit. Er stellte fest, daß die durch Anti-Hammelblutkörperchen-Kaninchenserum auftretende spezifische Agglutination von Hammelblutkörperchen durch Zugabe bestimmter menschlicher Seren gefördert werden kann. Die Agglutination ist dann noch in Verdünnungen sichtbar, in denen die alleinige spezifische Agglutination nicht mehr erkennbar ist. Der Autor fand eine Beziehung der Häufigkeit des Auftretens der Agglutinationsförderung zur klinischen Diagnose einer chronischen Polyarthrit, jedoch keine Parallelität zur Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und Blutgruppe. Der "Agglutination activating Factor" war bei 60°C für 1/2 Stunde hitzestabil. Während die spezifischen Agglutinine aus dem Immunserum durch native Hammelblutkörperchen vollkommen absorbiert wurden, wurde der agglutinationsfördernde Faktor nicht durch native, dagegen teilweise, aber nicht absolut durch sensibilisierte Hammelblutkörperchen absorbiert.

Schließlich entwickelten R o s e und Mitarbeiter ¹¹⁶ ihren Differentialagglutinationstest. Sie beobachteten, daß Rheumatikerseren auch normale, nicht sensibilisierte Hammelblutkörperchen bis zu einer gewissen Verdünnung agglutinieren können. Der Quotient des Titers, der mit sensibilisierten Erythrozyten erreicht wird, zu der durch einen heterophilen Antikörper gegen Schafer erythrozyten bedingten Agglutination wurde von R o s e und Mitarbeitern als Differentialagglutinationstiter der Bewertung zugrunde gelegt. Als Waaler-Rose-Test hat diese Methodik die serologische Rheumadiagnostik begründet. Wenig später haben H e l l e r und Mitarbeiter ⁵⁸ und S v a r t z und S c h l o s s m a n n ¹³² die heterophilen Antikörper durch vorherige Absorption an gewaschene Schafer erythrozyten eliminiert und so die reale Titerhöhe statt des Differentialagglutinationstiters ablesen können. Dieser modifizierte Waaler-Rose-Test (Heller-Svartz-Schlossmann-Test) ist noch heute üblich.

Später zeigte sich, daß statt der Schafer erythrozyten auch Erythrozyten anderer Tierarten ^{63, 111, 108, 146} oder patienteneigene Erythrozyten ¹⁴⁶ nach Sensibilisierung mit spezifischem Kaninchenantikörper, oder auch menschliche Rh+-Erythrozyten nach Sensibilisierung durch menschliche Rh-Antikörper ⁴⁶ verwandt werden können. Man verwendete schließlich sensibilisierte menschliche Erythrozyten der Blutgruppe 0, rh Ø, bei denen eine vorhergehende Absorption nicht notwendig ist, da diese Erythrozyten keine Agglutinogene enthalten ^{146, 42}.

Das Gemeinsame der bisherigen Modifikationen der Haemagglutinationsreaktion war, den agglutinierenden Faktor (Rheumatoid Arthritis Factor) im Serum von Patienten mit chronischer Polyarthritits auf Grund seiner Eigenschaft, sensibilisierte, d.h. mit Amboceptor beladene Erythrozyten zu agglutinieren, festzustellen. Weitere Modifikationen wurden mit dem Ziel entwickelt, durch Teilfraktionierungen des Serums das Ausgangsmaterial einzuengen und so zu besseren Ergebnissen zu gelangen. S v a r t z und S c h l o s s m a n n ^{133, 134, 136, 137} führten deshalb die CO₂-Fraktionierung und die Kältepräzipitation ein, wodurch sie besonders bei Verwendung des Kältepräzipitates zu besseren Ergebnissen im Sinne einer höheren Trefferquote und einer geringeren Quote falsch positiver Ergebnisse kamen. Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ verwendeten eine durch Dialyse gegen Phosphat-Citrat-Puffer gewonnene Euglobulin-Fraktion als Ausgangsmaterial (Euglobulin-Test).

H e l l e r und Mitarbeiter ⁶⁰ sowie W i n b l a d ¹⁴⁸ haben den Hämagglutinationstest schließlich insofern modifiziert, als sie den Agglutinationstiter durch Zugabe gewisser tierischer und auch menschlicher Seren steigern konnten. Als S.E.A.-Test (Serum Erythrocytes Agglutination) hat diese Modifikation mit Zugabe von Schafserum klinische Anwendung gefunden.

Eine für die Erforschung der Reaktionsweise des Rheumafaktors wesentliche Modifikation der Hämagglutinationsreaktion wurde der sog. FII-Test von H e l l e r und Mitarbeitern ⁵⁹. Er führte zu der Erkenntnis, daß die verwendeten Schaferythrozyten statt der Sensibilisierung mit Amboceptor auch mit menschlichem Gammaglobulin der Cohn-Fraktion II unspezifisch beladen werden können, wenn sie vorher mit Tannin behandelt wurden.

Ebenfalls wichtig für die Feststellung der serologischen Reaktionsweise des Rheumafaktors war die Entdeckung, daß statt Erythrozyten auch Kunststoffpartikel (z.B. Latex ¹²⁵) oder natürliche Kolloide (z.B. Bentonit ¹¹) verwendet werden können, die mit Gammaglobulin der Cohn-Fraktion II beladen werden. Der klinische Nutzen dieser Entdeckung schlägt sich in der Entwicklung des Latex-Fixationstestes durch S i n g e r und P l o t z ¹²⁵ und des sehr einfach durchzuführenden Latextropfentestes ⁹⁵ nieder. Vorläufer der heutigen Latex-Tropfentest-Methoden war eine von S i n g e r und

P l o t z ¹²⁶ beschriebene Objektträgermethode, bei der dem Serum oder Fingerbeerenblut eine Eosinlösung mit beladenen Latexpartikeln zugesetzt und die Agglutination auf dem Objektträger beobachtet wurde.

Es lassen sich also verschiedene Agglutinationssysteme zum Nachweis des Rheumafaktors verwenden. Das Entscheidende scheint zu sein, daß der Reaktant γ -Globulin ist, das spezifisch oder unspezifisch an Partikel gebunden ist, die Erythrozyten, aber auch andere Träger sein können. Damit erhob sich die Frage, ob die Trägersubstanzen lediglich als Indikatoren der Reaktion zu bezeichnen sind. Dafür spricht der Befund von E p s t e i n und Mitarbeiter ³⁰, daß der Rheumafaktor auch mit Gammaglobulin der Cohn-Fraktion II reagieren kann, wenn es nicht an einen Träger gebunden ist. Es zeigte sich jedoch, daß Gammaglobulin (Cohn-Fraktion II) besser mit dem Rheumafaktor reagiert, wenn es Aggregate bildet, was durch Erhitzen für 5-30 Minuten auf 63-65°C oder Behandlung mit Harnstoff, Methylmercaptan, Alkali oder Säure erreicht wird ^{28, 38, 9, 65, 94}. Auf dieser Reaktion zwischen Rheumafaktor und nicht an Trägersubstanzen gebundenem γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beruht die FII-Präzipitin-Reaktion von E p s t e i n ³⁰, wobei der Stickstoffgehalt des Präzipitates als Meßgröße für die zustandegekommene Präzipitation bestimmt wurde. Das gleiche Prinzip liegt der sog. Grenzschichtreaktion zugrunde, wie sie von K l e i n e und Mitarbeitern ⁶⁵ bzw. M ü l l e r und Mitarbeitern ⁹⁴ zur klinischen Diagnostik durchgeführt wurde. Es handelt sich um ein Überschichtungsverfahren, wobei an der Grenzschicht von γ -Globulin (erhitzte Cohn-Fraktion II) und Rheumatikerserum durch die Präzipitation bei Lichtdurchfall eine bestimmbare Strahlenablenkung auftritt.

Erst nachträglich fanden die Beobachtungen von C e c i l und Mitarbeitern ¹⁴ aus dem Jahre 1930, daß das Serum von Patienten mit chronischer Polyarthrititis hämolytische Streptokokken der Gruppe A agglutiniert, ihre Erklärung. Man hatte diesen Befund zunächst fälschlich für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Streptokokken angesehen und eine ursächliche Rolle der Streptokokken auch für die chronische Polyarthrititis diskutiert. Es stellte sich jedoch heraus, daß auch andere Bakterien durch Rheumatikerserum agglutiniert werden ^{20, 106, 105}. Nach L a m o n t - H a v e r s ⁷¹ lagern

sich bei Zugabe von Serum zu Streptokokken natürliche Antikörper gegen Streptokokken an diese an, wobei es jedoch wegen der geringen Konzentration nicht zur Agglutination kommt. Erst bei Anwesenheit von Rheumafaktor bindet sich dieser an die Antikörper und bewirkt so die Agglutination der Bakterien.

Somit haben alle Reaktionen gemeinsam, daß sich der Rheumafaktor an γ -Globulin bindet und eine Präzipitation oder, bei Anlagerung des Reaktanten an Trägersubstanzen, eine Agglutination hervorruft.

Historischer Überblick über die Inhibitionsreaktionen

Neue Aspekte des Rheumafaktornachweises brachte die Erforschung der die Agglutinationsreaktionen inhibierenden Wirkung des Serums. Die ersten diesbezüglichen Befunde gehen auf H e l l e r und Mitarbeiter ⁵⁹ zurück, die schon 1954 mitteilten, daß der Zusatz inaktivierter menschlicher Seren zum Hämagglutinationssystem eine Agglutinationshemmung verursacht. Die gleiche inhibitorische Aktivität hatte auch die Plasma-Fraktion II. Die Autoren sprachen bereits die Vermutung aus, daß sich die Cohn-Fraktion II gewissermaßen in Konkurrenz mit den sensibilisierten Hammelblutkörperchen befindet und daß wegen einer größeren Affinität der Fraktion II zum Rheumafaktor eine Inhibition auftritt. Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ vermuteten schließlich, daß auch in Seren von Patienten mit chronischer Polyarthritiden ein Inhibitor vorhanden sein könne, weshalb in solchen Fällen der Nachweis des Rheumafaktors mit Hilfe des Hämagglutinationssystems nicht gelingt. Auf Grund dieser Überlegungen wurde von Z i f f und Mitarbeitern ¹⁵³ schließlich die Euglobulinfraktion der Rheumatikerseren als Ausgangsmaterial für die Hämagglutinationsreaktion verwandt, die nur agglutinierende Fähigkeiten aufwies, wogegen der Überstand nach Euglobulinfraktionierung eine inhibitorische Aktivität zeigte. Im Gegensatz zu diesen bei Rheumatikerseren erhobenen Befunden hatte sich bei Seren von Nichtrheumatikern sowohl in der Euglobulinfraktion als auch in deren Überstand eine inhibitorische Aktivität gefunden. Diese Feststellungen führten einerseits zur Entwicklung des bereits erwähnten Euglobulintestes, wobei durch Verwendung von Euglobulin als Ausgangsmaterial für die Hämagglutinationsreaktion die Trefferquote bezüglich des Rheumafaktornachweises bei chronischen Polyarthritikern nicht unerheblich

gesteigert werden konnte¹⁵⁷. Weiterhin wurde der Inhibitionstest entwickelt¹⁵⁸, der in seinem Ansatz so angelegt ist, daß verschiedene Verdünnungen der Anglobulinfraction des zu untersuchenden Serums einem Agglutinationssystem aus einer konstanten Verdünnung eines bekannten positiven Rheumatiserums ('Referensserum') einer Sensibilisierten Schäferythrocyten beigegeben werden. Es wird also die inhibitorische Potens des zu untersuchenden Serums bestimmt, die umso geringer ist, je stärker die Konzentration sein muß, um die Agglutination durch das Referensserum noch aufheben zu können. In der Anglobulinfraction des Rheumatiserums, gewaschene Rote Blutkörperchen gegen Citrat-Phosphatpuffer nach Fällung durch CaCl_2 kaltes Wasser, war die inhibitorische Wirkung geringer als, aufgehoben, wodurch auch in Fällen, die in gewöhnlichem Agglutinationstest negativ waren, durch Nachweis des verminderten Inhibitions im Verhältnis zur agglutinierenden Aktivität ein positives Testergebnis erhalten werden kann. M i e b l e und P a t t i n s¹⁵⁹ haben die Methode in Deutschland nachgeprüft, indem sie mit Anglobulinfractionen wie 1 : 10 und 1 : 100 aus Wiedemann¹⁵⁷ inaktiviertes von Rheumatisches Antikörpern halbfestes Serum gegen Citrat-Phosphat-Pufferlösung dialysierten und sensibilisierte Schäferythrocyten als Reaktant verwendeten. S c h i e r s¹¹⁹ verwechselte die Testergebnisse mit seinen ebenfalls mit einem Agglutinationstest versehenen durchgeführten Inhibitionstest, die durch Ammoniumsulfat getriebene Fällung inaktiviert haben auch W e i s s e r¹⁶⁰ und Wiedemann¹⁵⁷. In obigen bestehen Übereinstimmungen bei Verdünnungen nach 1 : 10 und 1 : 100 gegenüber 1 : 1 und Wiedemann beschreiben, sie ergaben eine höhere Konzentration des Referensserums sollte, um eine sichere Bewertungsskala zu erreichen, während der Test weniger empfindlich als spezifischer wurde. S c h i e r s¹¹⁹ und Wiedemann¹⁵⁷ haben schließlich den Inhibitionstest in Verbindung mit den Lokalisationsstufen durchgeführt. Auch W e i s s e r¹⁶⁰ und Wiedemann¹⁵⁷ legten ihrer Modifikation der Lokalisationsstufen, nachdem, Praktiken jedoch stark Anglobulinfraction eines inaktivierten Serums gewaschen Vollserum als Ausgangsmaterial, das in mehreren Stufen, um die Wirkung eines filterablen Inhibitors, der in die Anglobulinfraction lokalisiert wurde¹⁶¹, mit zu erfassen. Einstellung des Referensserums und die Bewertungsskala werden ebenfalls von der früheren Modifikation anderer Autoren etwas ab. W e i s s e r¹⁶⁰ haben schließlich einen Inhibition-

best mit inaktiviertem Vollserum in Kombination mit dem Latexkropfen best durchgeführt, durch das ebenfalls die Trefferquote, besonders bei beginnenden und fraglichen Polymerisations, erhöht werden konnte

Reaktionsweise und Natur des Rheumafaktors

Reaktionen des Rheumafaktors in verschiedenen Systemen

M e y e r ²⁷, auf dessen bereits erwähnte Befunde einer agglutinationsfördernden Wirkung mancher Seren die Geschichte der Antikörperglobuline zurückgeht, hatte bereits festgestellt, daß der agglutinationsfördernde Faktor bei Erhitzen auf 56°C (30 min) hitzebeständig ist, dagegen bei 70°C (30 min) inaktiv wird. Er sah ferner, daß der entdeckte Faktor nur mit sensibilisierten Hammerythrozyten reagiert. Er traf somit auch bereits wesentliche Feststellungen über die Reaktionsweise dieses Faktors, ohne daß er zunächst eine Beziehung zur menschlichen Polyarthritiss sah, auf die erst W a s s e r ¹⁸⁵ aufmerksam machte, der außerdem die Hitzebeständigkeit bei 62°C (30 min) und ebenfalls die Reaktion nur mit sensibilisierten Hammelblutkörperchen betonte. Auch die Modifikationen des Waaler-Rose-Testes, bei denen statt Hammelblutkörperchen Erythrozyten anderer Tierarten oder menschliche Erythrozyten angewandt werden, erforderten zunächst die Sensibilisierung dieser Trägerzellen ^{186, 146, 42, 111, 63}. bis H e l l e r ⁵⁵ und Mitarbeiter ⁵⁹ 1954 die entscheidende Entdeckung machten, daß Erythrozyten statt der Sensibilisierung mit Antikörper auch unspezifisch mit menschlichem Gammaglobulin der Gamm-Fraktion II beladen werden können und auch dann mit dem Rheumafaktor reagieren. Allerdings war es notwendig, die Erythrozyten mit Tannin vorzubehandeln. Die weitere Entwicklung der Forschung ergibt, daß statt der beladenen Erythrozyten auch mit γ -Globulin beladene Kunststoffpartikel mit Rheumafaktor reagieren ^{125, 11} und daß sogar aggregiertes Gammaglobulin allein mit Rheumafaktor präzipitiert ^{30, 65, 94}. Damit war wahrscheinlich, daß der Reaktant γ -Globulin der Gamm-Fraktion II ist, an den sich der Rheumafaktor als Reaktor spezifisch bindet. Erythrozyten oder Kunststoffpartikel sind dabei lediglich Trägersubstanzen, die als Indikatoren die Agglutination sichtbar machen. Es wurde bereits erwähnt, daß auch die Agglutination bestimmter Bakterien bei Zugabe von Rheumafaktoren ^{14, 20, 106, 105} durch eine Anlagerung natürlicher, in allen Seren vorhandener Antikörper an die Bakterien zu erklären ist ⁷¹. Damit ist sicher, daß Rheumafaktor mit

spezifischem Ambozeptor gegen die verwendeten Blutkörperchen, ferner gegen die im patienteneigenen Serum vorhandenen unspezifischen Antikörper gegen bestimmte Bakterien und gegen menschliche Cohn-Fraktion II reagiert. In jedem Fall ist also der Reaktant γ -Globulin. Diese Tatsache, daß der Rheumafaktor mit γ -Globulin reagiert, führte zu der Feststellung, daß der Rheumafaktornachweis auf dieser Reaktion beruht.

Gammaglobulin-Aggregate als Reaktant

Es stellte sich heraus, daß nicht alle menschliche γ -Globulin-Präparationen ohne Bindung an einen geeigneten Träger mit dem Rheumafaktor reagieren. Elektrophoretisch isoliertes Gammaglobulin aus menschlichem Normalserum präzipitiert nicht mit Rheumafaktor³⁸. Es kann jedoch durch verschiedene Verfahren so verändert werden, daß es mit Rheumafaktor reaktionsfähig wird. Das Entscheidende scheint hierbei zu sein, daß dabei ein Teil der γ -Globuline Aggregate bildet. Dies kann z.B. durch Erhitzen für 5-15 Minuten auf 63-65°C oder Behandlung mit Harnstoff, Methylmerkaptan, Alkali oder Säure erreicht werden^{28, 38}. Dabei war nach E d e l m a n n und Mitarbeitern²⁸ die reaktivierende Wirkung von Harnstoff zusammen mit Methylmerkaptan besser als die Erhitzung für 10 min auf 63°C. Auch Guanidin war diesbezüglich wirksam. Jodacetamid blockiert die Aggregatbildung, indem es vermutlich die S-S-Brückenbildung verhindert²⁸.

C h r i s t i a n¹⁵ hat umfangreiche Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der wesentlichen Eigenschaften des Reaktanten durchgeführt. Mit einer Natriumsulfat-Fällungsmethode konnte er Cohn-Fraktion II und elektrophoretisch gewonnenes γ -Globulin weiter fraktionieren. Zwei der gewonnenen Unterfraktionen enthielten bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge außer 7S-Globulinen noch eine Komponente von S 30-40-Globulinen, falls diese im Ausgangsmaterial vorhanden waren. In der Cohn-Fraktion II konnten diese schweren Globuline nachgewiesen werden, während sie in elektrophoretisch gewonnenem γ -Globulin, das in nativem Zustand auch im Präzipitintest nach E p s t e i n (s.o.) nicht reagiert, erst nach Erhitzen für 10 min auf 63°C gefunden wurden. Bei erhitzter Cohn-Fraktion II verstärkte sich der ohnehin nachweisbare Gehalt an schweren Komplexen. Nach Erhitzen derjenigen Natriumsulfat-Fractionen, die bei Fraktionierung der Cohn-Fraktion II keine schwereren Komponenten ent-

hielten, wurde von C h r i s t i a n ¹⁵ ebenfalls das Auftreten schwererer Komponenten nachgewiesen. Der Hexose-Nitrogen-Quotient dieser schwereren Komponente unterschied sich nicht von dem der 7S-Globuline im Gegensatz zum normalen 19S-Globulin, das einen wesentlich höheren Kohlenhydratgehalt aufweist ⁹⁹. Somit dürfte es sich bei den gefundenen Komponenten um makromolekulartige Aggregate leichter γ -Globuline handeln, bei deren immunoelektrophoretischer Untersuchung gegen die betreffenden Antiseren D e i c h e r und B e h r e n d ²², genau wie bei nicht aggregierten Fraktionen, γ -Globulin, dagegen keine β_{2A} - oder β_{2M} -Globuline fanden. Im Präzipitintest nach E p s t e i n (s.o.) reagierten die Globulinpräparationen entsprechend ihrem Gehalt an S 30-40-Komponenten mit einer Präzipitation mit Rheumatiker Serum, gemessen am Stickstoffgehalt des Präzipitates im Vergleich zum Stickstoffgehalt des zugegebenen Proteins, d.h. Cohn-Fraktion II zeigte eine schwache Präzipitation, ihre Natriumsulfat-Unterfraktion mit Gehalt an 30-40S-Komplex eine deutliche, erhitze Cohn-Fraktion II ebenfalls eine deutliche, und die entsprechende Natriumsulfatfraktion der erhitzten Cohn-Fraktion II die deutlichste Präzipitation. Elektrophoretisch gewonnenes γ -Globulin war im Präzipitintest kein Reaktant. Allerdings gibt M ü l l e r ⁹³ an, daß er für seine Grenzschichtreaktion zunächst native γ -Globulin-Lösung verwendete, wobei aber wohl nicht sicher ist, ob in ihr alterierte γ -Globuline enthalten waren. Später hat er sie jedoch durch für 30 min auf 63°C erhitze γ -Globulin-Lösung wegen besserer Reaktionsfähigkeit ersetzt. Die Versuche von C h r i s t i a n ¹⁵ und von F r a n k l i n und Mitarbeitern ³⁸ machen zumindest deutlich, daß der Reaktant aggregiertes γ -Globulin sein muß. Das zeigte sich auch bei den Versuchen C h r i s t i a n 's ¹⁵, in denen er zur Durchführung des F II-Testes nach H e l l e r u. Mitarb. (s.o.) die tannierten Erythrozyten mit Cohn-Fraktion II sowie mit deren Natriumsulfatfraktion belud. Hier erwies sich die Natriumsulfat-Unterfraktion, in der die Aggregate nachgewiesen wurden, als der wirksamste Reaktant, während die Unterfraktionen ohne Gehalt an Aggregaten unwirksam waren. Die gesamte Cohn-Fraktion II war entsprechend ihrem Gehalt an Aggregaten relativ wirksam. Es zeigte sich damit, daß in der Cohn-Fraktion II durch den Präparationsvorgang bereits Aggregate vorhanden sein müssen, deren Anteil durch Erhitzen nach oben genannten Versuchen noch vermehrt werden kann. Es ist anzunehmen, daß durch

die Aggregation Molekularveränderungen zustandekommen, wie sie auch bei der Bindung der Antikörper- γ -Globuline an ein Antigen vorliegen.

Bei Verwendung von Latexpartikeln als Träger scheinen die Verhältnisse prinzipiell gleich zu liegen. B e r n h a r d und Mitarbeiter ⁹ nehmen jedoch an, daß bereits die Beladung der Latexpartikel als solche eine Aggregation der γ -Globuline bedingt. Die Autoren konnten nämlich zeigen, daß in einem auf der Messung der optischen Dichte des Überstandes der zentrifugierten Agglutinate beruhenden Latexfixationstest auch durch präparative Elektrophorese aus frischen Normalseren gewonnenes Human- γ -Globulin als relativ guter Reaktant angesehen werden kann. Auch D e i c h e r und B e h r e n d ²² stellten fest, daß Normalserum und durch Ultrazentrifugierung von Aggregaten befreite Cohn-Fraktion II im Latexfixationstest voll brauchbar war, was sie auf eine subtile Zustandsänderung der γ -Globulin-Moleküle durch Absorption an die Latexpartikel zurückführten. Überraschend ist die Feststellung dieser Autoren, daß nach ihren Untersuchungen vorher aggregatfreie Cohn-Fraktion II durch Erhitzen auf 63°C für 10 min trotz Aggregatbildung als Reaktant im Latexfixationstest unbrauchbar wird, obwohl nach B e r n h a r d und Mitarbeitern ⁹ Cohn-Fraktion II, die allerdings vorher nicht von Aggregaten befreit war, durch Erhitzen auf 63°C für 5-15 Minuten seine Fähigkeit als Reaktant im Latexfixationstest verbessert, unter gleichzeitigem Rückgang der Spontanagglutinationen. Auch hatten die bereits erwähnten Versuche von C h r i s t i a n ¹⁵ gezeigt, daß aggregatfreie Cohn-Fraktions-Präparationen bei Erhitzen für 10 Minuten auf 63°C die Bildung von Aggregaten zeigt.

B e r n h a r d und Mitarbeiter ⁹ bestätigen auch die Ansicht C h r i s t i a n 's ¹⁵, daß durch den Cohn-Fraktionierungs-Vorgang das in den Präparationen enthaltene γ -Globulin bereits als teilaggregiert angesehen werden muß, da schon die unerhitzte Fraktion im Gegensatz zu präparativ gewonnenem γ -Globulin (ohne Bindung an einen Träger) Komplement binden kann.

E d e l m a n n und Mitarbeiter ²⁸ sowie V a u g h a n ¹⁴⁰ haben über die bisher erwähnten Agglutinations- bzw. Präzipitationssysteme hinaus als weitere Modelle Antigen-Antikörper-Komplexe geschaffen, mit denen sie eine Reaktion des Rheumafaktors zeigen konnten. Nach diesen Untersuchungen reagiert Rheumafaktor auch mit

Präzipitation von menschlichen Serumalbumin-Kaninchen-Antialbumin bzw. Eialbumin-Kaninchen-Antieialbumin bzw. 7S- γ -Globulin-Kaninchen-Anti-7S- γ -Globulin (γ -Globulin zonenelektrophoretisch gewonnen). Anlässlich dieser Untersuchungen stellten die Autoren weiterhin fest, daß die Komplexe eine Sedimentationskonstante von mindestens 20S haben müssen, um mit Rheumafaktor reagieren zu können.

Rheumafaktoraktivität in verschiedenen Serumfraktionen

Neben diesen zur Erforschung des Reaktionsmechanismus des Rheumafaktors in verschiedenen Agglutinationssystemen wesentlichen Befunden zielten andere Untersuchungen darauf ab, die Lokalisation des Rheumafaktors in verschiedenen Serumfraktionen zu erforschen, um so zu einer Einengung des reaktiven Materials zu kommen. Meyer⁸⁷ stellte 1922 bereits fest, daß bei der CO₂-Fraktionierung des Serums sein "agglutinationsfördernder Faktor" sowohl im wieder gelösten Sediment als auch im Überstand gleich wirksam war. Viel später (1953) nahmen Svartz und Schlossmann^{133, 135} diese Untersuchungen wieder auf. Durch Einleiten von CO₂ in eisgekühltes Serum kommt es zu einem Präzipitat, mit dem nach Auffüllen auf das Ausgangsvolumen die Untersuchungen mit dem Hämagglutinationstest durchgeführt wurden. Auch bei Svartz und Schlossmann wurden sowohl das Präzipitat als auch der Überstand agglutinationsaktiv gefunden. Die Autoren glaubten, durch diese Methode zu einer größeren Spezifität des Hämagglutinationstestes zu kommen. Sie haben das Verfahren jedoch bald durch die sog. Kältepräzipitation^{137, 136} ersetzt, die größere wissenschaftliche Bedeutung erlangt hat. Die kältepräzipitierenden Proteine wurden früher "Kältefraktion"¹²⁷ bzw. Cryoglobuline⁷⁴ genannt. Das Präzipitat enthält nach elektrophoretischen Untersuchungen von Abrams und Mitarbeitern¹ vorwiegend γ -Globuline und wenig β -Globuline, und nach immunoelektrophoretischen Studien von Müller⁹³ vorwiegend γ -Globuline, α_2 - und β_2 -Makroglobuline. Das Kältepräzipitat fällt nach Mischen des Serums mit eiskaltem Aqua dest. und Aufbewahren bei + 4°C für 48 Stunden aus und wird nach Zentrifugation mit 0,85%iger NaCl-Lösung, der Überstand nach Gefriertrocknung mit 0,45%iger NaCl-Lösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Auch bei dieser Fraktionierungsmethode fand sich der agglutinierende Faktor sowohl im Präzipitat als auch in etwas geringerem Maß im Überstand^{137, 136}. Auch dieses Vorgehen erlaubt

also keine Aussage über die Lokalisation des Rheumafaktors im Eiweißspektrum. Nach S v a r t z und S c h l o s s m a n n ¹³⁷ soll die Kältepräzipitation jedoch dazu geeignet sein, den Rheumafaktor bei chronischer Polyarthrititis von den bei anderen Kollagenkrankheiten gelegentlich auftretenden hämagglutinierenden Faktoren abzutrennen, da sich letztere nur im Überstand finden sollen. Zudem soll die Ausbeute an positiven Ergebnissen bei chronischer Polyarthrititis höher sein.

Eine höhere Trefferquote erzielten auch Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ bei Anwendung einer Fraktionierungsmethode, bei der inaktiviertes Serum in Aqua dest. gelöst und gegen Citrat-Phosphat-Puffer dialysiert wird (genaue Methode bei ¹⁵³). Das mit Puffer-Kochsalzlösung pH 7,0 aufgefüllte Präzipitat enthält ebenfalls Rheumafaktor und verbesserte die Trefferquote wesentlich. Die Autoren machen darauf aufmerksam, daß dieses Ergebnis in erster Linie darauf beruhen dürfte, daß sich bei chronischen Polyarthritikern nur im Überstand eine inhibitorische Aktivität findet, während sich bei Nichtrheumatikern auch im Präzipitat Inhibitoren befinden. Die Fraktionierungsmethoden, bei denen, vielleicht mit einigen Differenzen in der Zusammensetzung, eine Euglobulinfraktion erhalten wird, vermag also über die Lokalisation des Rheumafaktors nicht viel auszusagen. Als Ausgangsmaterial für weitere Auftrennungen mögen sie jedoch einige Bedeutung besitzen.

Als weitere Fraktionierungsmethoden, die im Zusammenhang mit dem Rheumafaktornachweis angewandt wurden, sind die Salzsäurefällung (V a u g h n und Mitarbeiter ¹⁴³) und eine Salzfallung mit Ammoniumsulfat (W o l f s o n und Mitarbeiter ¹⁵⁰) zu erwähnen, die ebenfalls bessere Ergebnisse bringen sollen, ohne daß jedoch hinsichtlich der Lokalisation des Rheumafaktors nähere Schlüsse hieraus gezogen werden können.

In letzter Zeit ist eine Studie von M i c h e l i und Mitarbeitern ⁸⁸ veröffentlicht worden, die das Problem der Serumfraktionierungen zur Einengung des Rheumafaktors in etwas anderem Licht erscheinen läßt. Die Autoren glauben, daß die Verteilung der Agglutinationsaktivität auf das jeweilige "Euglobulin"-Präzipitat oder den Überstand allein vom End-pH der Präparationslösung abhängig ist. Jedenfalls konnten sie dies bei Versuchen mit der Dialyse-Fraktionierungsmethode nach Z i f f und Mitarbeitern ¹⁵³, der

Kältepräzipitation nach S v a r t z und S c h l o s s - m a n n ¹³⁶ und einer Ausfällung durch einen niedermolekularen Phosphatpuffer ⁸⁸ feststellen. Bei einem End-pH von 5,93 wurde die Aktivität vorwiegend bis ausschließlich im Präzipitat gefunden, während sich bei höheren pH-Werten die Aktivität auf Präzipitat und Überstand verteilte, um bei einem End-pH von 7,58 vorwiegend im Überstand aufzutreten. Bei der Fraktionierungsmethode nach Z i f f und Mitarbeitern ¹⁵³ fand sich das günstigste pH von 5,93, bei dem die Rheumafaktor-Aktivität in den meisten Fällen in der gewonnenen Fraktion erscheint, während der Überstand meist inaktiv war. Am ungünstigsten lagen die Verhältnisse beim Kältepräzipitat mit einem End-pH von 7,58. Hier fand sich die Aktivität mehr im Überstand als im Präzipitat. Vor allem stellten M i c h e l i und Mitarbeiter ⁸⁸ fest, daß bei der Aktivitätsverteilung auf Präzipitat und Überstand kein Unterschied der Agglutination im Test mit sensibilisierten Schaferythrozyten und im Latexfixationstest hinsichtlich positiver Ausfälle bei chronischer Polyarthrit, Lupus erythematodes, Lebercirrhose oder anderen "unspezifischen" Agglutinationsfaktoren bestand. Diese Ergebnisse liefern neue Aspekte bezüglich der Möglichkeiten, durch Serumfraktionierungen den Rheumafaktor einzuengen, entmutigen aber andererseits hinsichtlich der von S v a r t z und S c h l o s s - m a n n ¹³⁷ angedeuteten Möglichkeit, den Rheumafaktor von Anti- γ -Globulinen bei anderen Erkrankungen durch Fraktionierungsmethoden abtrennen zu können.

Lokalisation des Rheumafaktors im Proteinspektrum mit serologischen und immunologischen Methoden

Eine Ergänzung zu diesen bisherigen Einengungsbemühungen brachte die Feststellung von W a a l e r ¹⁴⁵, der mittels einer Ammoniumchloratfällung den "agglutination activating factor" in die Globulinfraktion lokalisierte, wogegen noch M e y e r ⁸⁷ ein Vorkommen sowohl in der Globulin- als auch in der Albuminfraktion annahm. R o s e und Mitarbeiter ¹¹⁶ erhielten durch eine elektrophoretische Auftrennung Hinweise dafür, daß die Wirkung des agglutinierenden Faktors in der β - γ -Globulinfraktion der Seren von chronischen Polyarthritikern zu suchen ist. Nach Untersuchungen von H e l l e r und Mitarbeitern ⁶¹ mit der Cohnfraktionierung ¹⁸ mit geringer

Modifikation ließ sich die agglutinierende Aktivität in der Fraktion III, die vorwiegend β -Globuline, aber auch α - und γ -Globuline enthält, feststellen, während die Fraktionen II, VI₁ und V keine Agglutinationswirkung ergaben, womit eine Lokalisation in der Albumin-, α - und γ -Globulinfraktion fraglich erschien. Spätere Untersuchungen mit der kontinuierlichen Elektrophorese z.B. von Müller⁹³ und Antonaci und Mitarbeitern³ bestätigen schon den von Rose und Mitarbeitern¹¹⁶ erhobenen Befund einer starken Anreicherung im β - γ -Globulinbereich. Bei der zonenelektrophoretischen Auftrennung des Kältepräzipitates fanden Svartz und Schlossmann¹³⁷ die Agglutinationsaktivität im γ -Globulinbereich.

Da jedoch die γ -Globulin-Fraktion komplex ist, blieb zu untersuchen, welcher Unterfraktion der Rheumafaktor angehört. Mit der Papierelektrophorese und auch mit der freien Elektrophorese ist eine weitere Auftrennung nicht möglich, zumal die schnell wandernde γ_1 -Fraktion²⁵ nach der gültigen Definition der γ -Globuline⁴ nicht zu diesen gehört und deshalb jetzt als β_2 -Globulin bezeichnet⁴⁵ wird. Die β_2 -Globuline erfuhren dann durch die Entdeckung des β_{2M} -Globulins durch Scheidegger¹¹⁸ noch eine weitere Aufteilung, weshalb zur Unterscheidung das bisherige β_2 -Globulin in β_{2A} -Globulin umbenannt wurde. Nach Burtin⁴⁴ besteht das β_2 -Makroglobulin aus einer Vielzahl verschiedener Proteine mit gleicher Antigenspezifität. Nach Franklin und Mitarbeitern³⁸ enthält es Isoagglutinine, Wassermann-Antikörper, die kompletten Rh-Agglutinine und einige pathologische Hämagglutinine. Die β_2 -Globuline bilden zusammen mit den γ -Globulinen die Gruppe der Immunglobuline⁴³. Heremans⁶² schlägt jedoch vor, die β_2 -Globuline zu den γ -Globulinen zu zählen und das β_{2A} -Globulin als γ_{1A} -Globulin und β_{2M} -Globulin als γ_{1M} -Globulin zu bezeichnen, eine Nomenklatur, der wir jedoch nicht folgen.

Immunelektrophoretische Untersuchungen lieferten Anhaltspunkte dafür, daß auch der Rheumafaktor im β_{2M} -Globulin lokalisiert ist. Immunelektrophoretisch wurde von den meisten Untersuchern^{62, 32, 17, 34, 16, 77, 93} neben einigen, im Rahmen des Entzündungsgeschehens vermehrten Proteinen vor allem eine Vermehrung der β_2 -Makroglobuline gefunden, während andere Autoren^{6, 19} eine solche nicht feststellen konnten.

In Anbetracht der Annahme, daß der Rheumafaktor im β_{2M} -Bereich lokalisiert ist, waren Vergleichsuntersuchungen zwischen immunoelektrophoretischer β_{2M} -Globulin-Vermehrung und Agglutinationsgrad bzw. -titer der Seren in den Agglutinationstesten interessant. Bei Auswertung der Fallzahlen mit einer Parallelität zwischen β_{2M} -Globulin-Vermehrung und Positivität in den Agglutinationstesten stellten **F r a n c q** und Mitarbeiter ³⁴ sowie **M ü l l e r** ⁹³ eine gute Übereinstimmung, jedoch keine Abhängigkeit der β_{2M} -Globulin-Vermehrung vom Agglutinationsgrad bzw. -titer fest ^{34, 93, 32}. **F r a n c q** und Mitarbeiter ³³ haben schließlich ein Harnstoff-Eluat eines Rheumafaktor- γ -Globulinkomplexes immunoelektrophoretisch untersucht und konnten damit den Rheumafaktor als β_2 -Makroglobulin identifizieren. Es fanden sich jedoch keine Anhaltspunkte für eine Antigen-spezifität des Rheumafaktors im β_2 -Makroglobulin, wie Untersuchungen im Agardiffusionstest nach Ouchterlony zeigten. Gegen ein Anti- β_{2M} -Globulinserum ergaben Normalseren, rheumafaktor-positive Seren sowie mit verschiedenen Methoden eingengter Rheumafaktor keine Antigen-spezifität ^{68, 6}.

Schließlich wurde versucht, Antiseren gegen rheumafaktorhaltige Präparationen zu gewinnen, um damit die Möglichkeiten immunologischer Untersuchungen zu erweitern. Die hiermit erzielten Ergebnisse waren aber nicht sehr ergibig. **C l e v e** und **H a r t m a n n** ¹⁷ haben durch Immunisierung von Kaninchen mit Rheumatikerserum ein "spezifisches" Antirheumatikerserum gewonnen und mit diesem Untersuchungen im Agardiffusionstest nach Ouchterlony durchgeführt. Sie fanden eine Antikörper-Vermehrung im β_{2M} -, β_{2A} - und γ -Globulinbereich. Bei Absättigung des Rheuma-Antiserums mit Normalserum verblieb eine Vermehrung im β_2 -, β_1 -, α_2 - und Orosomucoidbereich. **C l e v e** ¹⁶ berichtet schließlich über eine zusätzliche Linie im β_2 -Bereich bei Verwendung eines Anti-Rheumaserums. **F r a n c q** und Mitarbeiter ³⁴ stellten Antiseren aus mit Rheumafaktor im Häm-agglutinationstest agglutinierten sensibilisierten Erythrozyten durch Immunisierung von Kaninchen her und wiesen mit der Immunelektrophorese β_{2M} -Globulin und γ -Globulin nach. Ähnliche Untersuchungen führte **M ü l l e r** ⁹³ durch, der mit rheumafaktor-aktiven Kältepräzipitaten Kaninchen immunisierte. Er konnte jedoch im Agardiffusionstest und in der Immunelektrophorese keinerlei Antigen- bzw. Antikörperspezifität feststellen. Auch **K u n k e l**

und Mitarbeiter ⁶⁸ kamen zu gleichen Ergebnissen bei Untersuchungen mit durch Immunisierung mit eingeeignetem Rheumafaktor gewonnenem Antiserum. Nur B a r t f e l d ⁶ glaubte, mit einem durch Immunisierung mit der Euglobulinfraktion rheumafaktorhaltiger Seren erzeugten Antiserum im Agardiffusionstest zusätzliche Präzipitationslinien gesehen zu haben, die jedoch bei Absorption des Antiserums mit normaler Globulinfraktion verschwanden und deshalb als nicht spezifisch angesehen werden konnten.

Charakterisierung des Rheumafaktors durch Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge und Bedeutung der hierbei gefundenen löslichen Komplexe

Die Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge haben die Möglichkeiten zur Aufklärung der Natur des Rheumafaktors noch wesentlich erweitert. Eine durch Elektrophorese gewonnene γ -Globulin-Fraktion auch normaler Seren enthält eine schnelle Komponente von einer Sedimentationskonstanten von 19S (Molekulargewicht 950 000 - 1 000 000) und eine langsam sedimentierende Komponente von 7S (Molekulargewicht etwa 160 000). B e h r e n d und C l e v e ⁸ erhielten durch wiederholte Ultrazentrifugation von rheumafaktor-positiven Seren ein Makroglobulinpräparat mit angereichertem Rheumafaktor, das in der Immunelektrophorese β_{2M} -Globulin, α_2 -Makroglobulin sowie in geringer Ausprägung niedermolekulares γ -Globulin zeigte. Sie halten das β_{2M} -Globulin für das Protein, in dem sich der Rheumafaktor befindet. Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge von S v a r t z ^{129, 130} bzw. S v a r t z und Mitarbeitern ¹³¹ mit rheumafaktorhaltigen Seren oder Kältepräzipitaten zeigten ebenfalls, daß der Rheumafaktor in der Makroglobulinfraktion zu suchen ist. Es ergab sich ein Sedimentationskoeffizient von 19S (Molekulargewicht etwa 900 000) bzw. etwas geringer (18,7S). Später haben S v a r t z und Mitarbeiter ^{131, 129} ihr Kältepräzipitat durch Chromatographie mit dem Kationenaustauscher Carboxymethylcellulose gereinigt, indem sie die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer hämagglutinierenden Fähigkeit untersuchten und die Fraktion mit dem höchsten Agglutinationstiter einer Untersuchung mit der Ultrazentrifuge zuführten. Es ergab sich wiederum eine Sedimentationskonstante von 18-19S. Da nach den oben aufgeführten Untersuchungsergebnissen einerseits die Rheumafaktoraktivität im β_2 -Makroglobulin-

bereich zu suchen ist und andererseits eingengter Rheumafaktor in der Ultrazentrifuge eine Sedimentationskonstante von 19S aufweist, kann angenommen werden, daß das β_2 -Makroglobulin des Rheumafaktors in der Ultrazentrifuge eine Sedimentationskonstante von 19S besitzt.

Neben der physiologischen 19S-Fraktion fanden jedoch M ü l l e r - E b e r h a r d und Mitarbeiter¹⁰⁰, F r a n k l i n und Mitarbeiter³⁸ sowie S v a r t z¹³⁰ in vielen Fällen von chronischer Polyarthrititis noch eine weitere Fraktion mit einer Sedimentationskonstanten von etwa 22S. Es sind zahlreiche Versuche unternommen worden, um die Rolle dieser unphysiologischen Komponente zu klären. Untersuchungen von M ü l l e r - E b e r h a r d⁹⁷ haben gezeigt, daß es sich hier nicht um ein atypisches Protein handelt. In einer Euglobulinfraktion, die die 22S-Komponente enthält, kann diese nach Zugabe von 3-6 molarer Harnstofflösung nicht mehr mit der Ultrazentrifuge nachgewiesen werden, wobei die Konzentration von 19S- und 7S-Globulinen zunimmt. Nach Dialyse des Harnstoffs gegen 5%ige NaCl-Lösung tritt jedoch der 22S-Komplex wieder auf. Es handelt sich also um einen reversibel dissoziierbaren Komplex. Der 22S-Globulinkomplex ist jedoch serologisch aktiv im Sinne der Rheumafaktoragglutination, wie die Verminderung dieser Komponente im überstehenden Polyarthritikerserum nach Durchführung des Präzipitationstestes mit Cohn-Fraktion II und Abzentrifugieren des Präzipitates zeigt^{38, 100}. E d e l m a n n und Mitarbeiter²⁸ erwähnen, daß auch die 7S-Komponente dieses 22S-Komplexes, also der unversehrte Komplex mit den Aggregaten präzipitiert. Diese Feststellung wurde durch Untersuchungen mit markiertem 7S- γ -Globulin getroffen. Nach Dissoziation des 22S-Komplexes in Euglobulinfraktionen oder Präzipitaten durch Glykokollpuffer pH 3 zeigt sich nach Ultrazentrifugation mit Stabilisierung der Zonen durch einen Dichtegradienten und Trennung durch schichtweises Abpipettieren oder Auffangen in einem Fraktionssammler, daß die neben der 7S-Komponente auftretende 19S-Fraktion serologisch hoch aktiv war⁶⁸. M ü l l e r - E b e r h a r d⁹⁷ nimmt an, daß es sich um eine Bindung des Rheumafaktors auf Grund seiner pathologischen Fähigkeit, γ -Globuline an sich zu lagern, handelt, wobei es in diesem Fall jedoch nicht zur Präzipitation durch Überschreiten der Löslichkeitsgrenze kommt. Ob es sich auch bei den 7S-Globulinen, die

zur Bindung an die 19S-Globuline befähigt sind, um alterierte Proteine, entsprechend der Bindungsfähigkeit des Rheumafaktors an aggregierte γ -Globuline, handelt, ist wohl nicht zu entscheiden. Vielleicht kommt die Präzipitation dadurch nicht zustande, das keine Veränderung dieses Proteins vorliegt, vielleicht haben wir es aber auch mit einem 7S-Globulin zu tun, daß auf Grund eines noch nicht bekannten Vorganges entsteht oder in bestimmter Weise verändert wird.

Die Präzipitate des Rheumafaktors mit aggregiertem Gammaglobulin sind im übrigen in 3-6 molarer Harnstoff-Lösung oder in Glykokollpuffer pH 3 löslich^{100, 97} und lassen in der Ultrazentrifuge eine 19S- und eine 7S-Komponente sowie auch Komponenten mit langsamer Sedimentationskonstante erkennen, die den γ -Globulin-Aggregaten entsprechen.

Es ist die Frage, ob dieser 22S-Komponente die alleinige Bedeutung bezüglich der Aktivität des Rheumafaktors zukommt. Zumindest zeigen die Fälle, in denen die 22S-Komponente nachgewiesen wurde, die stärkste Aktivität in den Agglutinations- bzw. Präzipitationstesten³⁹. Franklin und Mitarbeiter³⁹ sowie Müller-Eberhard⁹⁷ geben zu bedenken, daß auch in den Fällen der Polyarthritiker mit positiver Agglutinationsreaktion, in denen die 22S-Fraktion mit der Ultrazentrifuge nicht mehr nachzuweisen war, dieses auf die relativ geringe Empfindlichkeit der ultrazentrifugalen Untersuchung zurückgeführt werden kann, so daß Mengen, die eine gewisse Mindestkonzentration unterschreiten, nicht nachgewiesen werden können. Dafür würden die Untersuchungen Christian's¹⁵ sprechen, nach denen die Zugabe einer Cohn-Fraktion 11-Unterfraktion mit stark angereicherten γ -Globulin-Aggregaten (s.o.) zu Rheumatiker-serum die 22S-Komponente aus dem Serum verschwinden läßt, wogegen die 19S-Komponente keine Veränderung zeigte. Andererseits ist aber die aus dissoziierten Komplexen gewonnene 19S-Komponente serologisch aktiv⁹⁷. Christian¹⁵ diskutiert andererseits jedoch, ob die aktive 19S-Komponente entweder die Bindung an nicht aggregiertes 7S- γ -Globulin mit Bildung des löslichen 22S-Komplexes oder an aggregiertes 7S- γ -Globulin mit Präzipitation eingehen kann. Damit möchte er die inhibitorische Wirkung großer Mengen unaggregierten γ -Globulins auf die Präzipitationsreaktion des Rheumafaktors erklären. Es scheint, als ob die Frage der Vorgänge der Reaktion

des Rheumafaktors mit dem aggregierten γ -Globulin besonders im Hinblick auf den Rheumafaktor selbst als Reaktionsteilnehmer noch lange nicht endgültig geklärt ist.

In letzter Zeit haben K u n k e l und Mitarbeiter ⁷⁰ bei Ultrazentrifugenuntersuchungen einen weiteren Komplex in Rheumatikern mit Sedimentationskonstanten von 10-15S aufgefunden, der in Säurepuffer und 4-6 molarer Harnstofflösung in 7S-Einheiten dissoziiert, die immunologisch als γ -Globuline identifiziert wurden. Sie finden sich gelegentlich in Seren von Patienten mit chronischer Polyarthrititis mit hohem Rheumafaktor-Gehalt. Es wurde diskutiert, ob bei diesem sog. "Intermediär-Komplex" eine Verbindung eines 7S-Rheumafaktor mit anderen 7S- γ -Globulinen vorliegt ⁶⁷. Nach T o m a s i (zit. ⁶⁷) dissoziiert dieser Komplex bei Säuredialyse auf pH 3,5. Der Komplex bildet sich wieder bei pH 7. Durch Behandlung mit 10 molarem β -Mercaptoaethanol dissoziiert der Komplex nicht, ein Zeichen dafür, daß zweiwertige Disulfid-Bindungen hier nicht beteiligt sind. Bei den Seren mit nachweisbarem Intermediärkomplex war dieser im Latexfixationstest stark positiv, genauso wie auch die 19S- und 7S-Globuline, während Vergleichsseren von serologisch positiver chronischer Polyarthrititis ohne Intermediärkomplex (anscheinend auch ohne 22S-Komplex) nur in der 19S-Komponente eine Aktivität zeigten. Bei der Sulphydrylreduktion mittels β -Merkaptoaethanol verloren die Seren mit Intermediärkomplex die Hälfte ihrer Aktivität, während die Seren ohne Intermediärkomplex einen vollständigen Aktivitätsverlust zeigten. Hieraus wird geschlossen, daß es sich bei den Intermediärkomplexen um einen 7S-Rheumafaktor handelt, der, analog zum 22S-Komplex aus 19S- und 7S-Globulin, einen Komplex mit 7S- γ -Globulin bildet.

Heterogenität des Rheumafaktors

Die Auffindung verschiedener agglutinationsaktiver Globuline bei den Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge mit Sedimentationskonstanten von 19S und 7S, die zudem aktive Komplexe von etwa 22S bzw. 10-15S bilden können, zeigt bereits, daß die Rheumafaktoren eine Heterogenität aufweisen. Neben diesen bereits geschilderten Befunden sprechen jedoch noch weitere Beobachtungen für eine Heterogenität zumindest der Reaktionsweisen, wenn nicht des molekularen oder strukturellen Aufbaues der aktiven Proteine. So fanden sich Faktoren

mit ausschließlicher Humanspezifität, mit ausschließlicher Spezifität für tierische γ -Globuline und solche, die mit γ -Globulinen mehrerer Spezies reagieren ^{76, 57, 36, 35}. Damit erklären sich die Befunde, nach denen manche Seren von Patienten mit chronischer Polyarthrits nur positive Ergebnisse mit den Agglutinationsreaktionen ergeben, bei denen der Reaktant Kaninchenambozeptor ist, während wieder andere nur mit den mit menschlichem γ -Globulin beladenen Blutkörperchen oder Kunststoffpartikeln reagieren. In den meisten Fällen dürfte jedoch eine Parallelität der Befunde bestehen, die für eine gleichzeitige Kreuzreaktion mit γ -Globulin am Menschen und vom Kaninchen spricht.

S e i f e r t ¹²³ hat versucht, die Rheumafaktoren in solche zu trennen, die mit sensibilisierten Schafblutkörperchen, mit tannierten und mit menschlichem γ -Globulin beladenen Schafblutkörperchen, mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln und mit natürlichen Antikörpern beladenen Streptokokken bzw. gleichzeitig in mehreren dieser Reaktionen agglutinierend reagieren. Den Versuch von S e i f e r t ¹²³, zwei latexagglutinierende Faktoren unterscheiden zu können, je nachdem sie vorwiegend im CO_2 -Präzipitat (unterschiedlich nach Einleiten von CO_2 in der Kälte oder bei Zimmerwärme) oder im Überstand erscheinen, halten wir nicht für stichhaltig.

Schließlich hat sich durch die umfangreichen Untersuchungen von G r u b b ^{49, 46, 47, 48}, G r u b b und L a u r e l l ⁵⁰ sowie H a r b o e ⁵³ und H a r b o e und L u n d e v a l l ⁵⁴ gezeigt, daß "gruppenspezifische" Rheumafaktoren existieren, die durch genetisch determinierte Gruppeneigenschaften des γ -Globulins bedingt sind, wodurch sie nur mit bestimmten menschlichen γ -Globulinen reagieren. Dieses Phänomen hat seine Ursache in der genetisch unterschiedlichen Konfiguration des γ -Globulin-Moleküls. Die Entdeckung dieser Tatsache geht auf die Beobachtung zurück, daß nur ein gewisser Prozentsatz aller menschlicher Seren in der Lage ist, die Reaktion zwischen Rheumafaktor und den mit bestimmten Rh-Antikörpern beladenen menschlichen Rh-positiven Erythrozyten zu inhibieren. Die Inhibitionseigenschaft, die als Gm^a bezeichnet wird, wird als durch den Genotypus $\text{Gm}^a \text{Gm}^a$ oder $\text{Gm}^a \text{Gm}^b$ bedingt angenommen, während der Phänotypus Gm^a -, der keine bzw. eine quantitativ weitaus geringere Inhibitionseigenschaft besitzt, durch

den Genotypus $Gm^b Gm^b$ charakterisiert ist. Die Rheumafaktoren, die die Agglutination der mit Rh-Antikörpern sensibilisierten Erythrozyten bedingen, werden je nach der möglichen oder nicht möglichen Inhibition durch $Gm(a+)$ oder $Gm(a-)$ als Anti- $Gm(a)$ oder Anti- $Gm(b)$ bezeichnet. Nach Harboe und Lundevall⁵⁴ soll im übrigen noch ein weiteres Paar alleler Gene existieren, das als Gm^x und Gm^y bezeichnet wurde, wozu auf Grund neuerer Anschauungen evtl. noch weitere Faktoren der Gm-Gruppe kommen, die mögliche, noch weniger erforschte Unterschiede zwischen den Rheumafaktoren aufzeigen.

Nach diesen Feststellungen interessierte es, ob eine dieser Anti-Gm-Gruppen bei Patienten mit chronischer Polyarthrits gegenüber der Gesamtbevölkerung gehäuft vorkam, womit eine bestimmte γ -Globulin-Gruppe für die Entstehung des Rheumafaktors als prädisponiert erkannt werden würde. Eine solche Abweichung von der Gesamtpopulation wurde jedoch nicht gefunden^{49, 112, 24}. Somit ist anzunehmen, daß die Rheumafaktoren lediglich eine genetisch bedingte Determination aufweisen, sich aber im übrigen nicht oder kaum voneinander unterscheiden.

Schließlich wurden von Ropartz und Mitarbeitern¹¹⁵ außer den Gm-Gruppen-Eigenschaften noch sog. Inv-Gruppeneigenschaften beschrieben, die unabhängig von ersteren vererbt werden. Harboe und Mitarbeiter⁵⁵ sowie Franklin und Mitarbeiter³⁷ glauben, daß die Gm- und die Inv-Eigenschaften an verschiedenen Stellen des γ -Globulin-Moleküls lokalisiert sind. Die Inv-Eigenschaft befindet sich auf der sog. S-Komponente, die auch die für die Kreuzreaktionen mit β_{2A} - und β_{2M} -Globulinen verantwortlichen Determinanten enthält. Die Gm-Eigenschaft ist dagegen in der sog. F-Komponente lokalisiert, die die spezifischen 7S- γ -Globulin-Determinanten verkörpert.

Anti-Gammaglobulin-Faktoren bei anderen Erkrankungen und bei Gesunden

Bei Anwendung verschiedener Agglutinationssysteme wurden auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen in auffallender Häufigkeit agglutinierende bzw. präzipitierende Faktoren gefunden. Das gilt besonders für den Lupus erythematodes disseminatus^{78, 27, 93, 151},

die Periarteriitis nodosa⁹³, die Sklerodermie^{151, 93} und die Dermatomyositis^{151, 93}, die unter dem Begriff der Kollagenkrankheiten zusammengefaßt werden und eine gewisse Verwandtschaft zur chronischen Polyarthrititis zeigen. Allerdings erreicht die Zahl der positiven Ausfälle nie annähernd den Prozentsatz, wie er bei der chronischen Polyarthrititis gefunden wird. Am häufigsten wird ein Anti-Gammaglobulin-Faktor noch beim Lupus erythematoses disseminatus gefunden.

Dagegen besitzt der Nachweis des Rheumafaktors bei der chronischen Polyarthrititis gegenüber anderen Erkrankungen innerhalb des rheumatischen Formenkreises, wie z.B. gegenüber der akuten Polyarthrititis, dem M. Reiter, der Harnsäuregicht und den Arthrosen differentialdiagnostischen Wert, indem er bei diesen Erkrankungen nicht auffallend häufig gefunden wird. Beim M. Bechterew scheinen nach M i e h l k e und Mitarbeitern⁸⁹ insofern Unterschiede zu bestehen, als bei der sog. skandinavischen Form mit Beteiligung der peripheren Gelenke häufiger positive Ausfälle gefunden wurden, eine Ansicht, die M ü l l e r und S c h u p p⁹⁵ allerdings nicht teilen. Bei der Arthritis psoriatica gehen die Meinungen jedoch auseinander, indem D r e s n e r und T r o m b l y²⁷ gegenüber anderen Literaturangaben⁹⁷ relativ häufig positive Ausfälle sahen.

Bei der Silikose kennt man ein als Caplan-Syndrom bezeichnetes Bild mit Gelenkbeteiligung, das in auffällender Häufigkeit einen positiven Ausfall der Agglutinationsreaktionen zeigt⁹¹. Aber auch bei der Silikose ohne Gelenkbeteiligung scheint ein Anti-Gammaglobulin-Faktor häufig zu sein^{89, 90, 26}. D i e k m a n n s und F r i t z e²⁶ sehen in dem Auftreten pulmonaler Rundherde bei der Silikose eine der chronischen Polyarthrititis entsprechende Reaktionslage, da sie in solchen Fällen auch ohne vorliegendes Caplan-Syndrom häufig positive Agglutinationen fanden.

Aber auch bei bestimmten Erkrankungen außerhalb des rheumatischen Formenkreises werden Anti-Gammaglobulin-Faktoren gefunden. Besondere Beachtung verdienen hier die Hepatitis und die Leberzirrhose, bei denen auffallend häufig positive Agglutinationsreaktionen auftreten^{93, 27}. Bei zwei eigenen Untersuchungsreihen^{84, 85} waren die Ergebnisse unterschiedlich, im allgemeinen fanden jedoch auch wir häufiger als bei Gesunden positive Agglutinationsreaktionen. Weitere Erkrankungen mit vermehrten positiven Agglutinationsreaktionen, die

nach der vorliegenden Literatur (zit. ⁹³) Erwähnung verdienen, sind die Sepsis lenta, unspezifische und tuberkulöse Lungenerkrankungen, Syphilis und M. Boeck. In einer eigenen Versuchsreihe fanden wir bei M. Boeck keine signifikante Häufung positiver Ausfälle im Latextropfentest. Dresner und Trombly heben schließlich noch Virusinfektionen (Herpes zoster, infektiöse Mononukleose und Virus-Pneumonie) hervor, wobei allerdings nur relativ wenige Fälle ausgewertet wurden. Interessant ist schließlich der Befund eines Anti-Gammaglobulins bei der Makroglobulinämie Waldenström. 81
27

Über die Natur dieser Anti-Gammaglobulin-Faktoren ist nichts Sicheres bekannt, es hat sich jedoch gezeigt, daß die Faktoren, wie sie beim M. Boeck, bei der Syphilis, bei der Hepatitis und Lebercirrhose vorkommen, anscheinend gegenüber dem Rheumafaktor seltener Kreuzreaktionen mit Kaninchen- γ -Globulin ergeben, also z.B. im Waaler-Rose-Test viel seltener positiv sind als im FII-Test und im Latexagglutinationstest ^{64, 96, 109}. Hieraus ergeben sich vermutlich bereits immunologische Unterschiede gegenüber dem Rheumafaktor. Dagegen hat sich bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge kein Unterschied in der Sedimentationskonstanten zwischen Rheumafaktor und Anti-Gammaglobulin-Faktoren bei nicht rheumatischen Erkrankungen ergeben ^{64, 109, 76, 27}. Nur bei der Makroglobulinämie Waldenström wird ein abnormes Globulin von einer Sedimentationskonstanten von 15-32 S angegeben ²⁷, das auf eine abartige Eiweißsynthese bei dieser Erkrankung zurückgeführt werden kann. Bei viralen und bakteriellen Erkrankungen mögen Antigen- und Antikörper-Komplexe ein Antigen für die Bildung eines Anti-Gammaglobulins mit Antikörpernatur, wie es auch im Falle des Rheumafaktors diskutiert wird, darstellen. Es müssen jedoch noch weitere Faktoren hinzukommen, weil sonst nicht erklärbar ist, warum bei diesen Erkrankungen im Vergleich zur chronischen Polyarthrititis die positiven Agglutinationen doch relativ selten sind.

S v a r t z ¹²⁸, S v a r t z und S c h l o s s m a n n ^{135, 137},
H a r t e r ⁵⁶ sowie B l a c k und Mitarbeiter ¹⁰ hofften, durch die bereits beschriebene Kältepräzipitation des Serums eine Trennung der Rheumafaktoren von den agglutinierenden Faktoren bei anderen Erkrankungen vornehmen zu können. Das erscheint jedoch nach den Untersuchungen anderer Autoren ^{88, 64, 141, 32, 149} sowie auch nach

eigenen, unten dargestellten Befunden nicht möglich.

Schließlich ist auch bei Gesunden in einem, nach Untersuchern und verwendeter Methodik schwankenden, geringen Prozentsatz der Nachweis eines Anti-Gamma-Globulin-Faktors möglich ^{78, 93}. Nach unseren Untersuchungen mit dem Latextropfentest bei Verwendung von Reagentien der Behring-Werke wurde ein Prozentsatz von etwa 2% festgestellt ⁷⁹. Gehäuft kommt ein agglutinierender Faktor anscheinend in Familien von Patienten mit chronischer Polyarthritits vor ^{5, 7, 60, 73, 120, 154}. Dieser Befund spricht für die Beteiligung hereditärer Faktoren beim Auftreten der Anti-Gammaglobuline. In den von uns festgestellten sog. falsch positiven Ergebnissen bei Gesunden handelte es sich stets um eine relativ schwache Agglutination und um niedrige Titer. Bei stärkerer Konzentration des zu untersuchenden Serums erhöht sich jedoch die Zahl der Agglutination in gesunden Seren beträchtlich, so daß eine gewisse agglutinierende Potenz in einer großen Anzahl von Seren festgestellt werden kann. Damit ist zu diskutieren, ob auch bei Gesunden grundsätzlich ein Anteil der Immunglobuline in geringem Ausmaß zu einer Reaktion im Sinne der Anti-Gammaglobulin-Faktoren fähig ist. Nach Müller - Eberhard ⁹⁸ und Taranta und Mitarbeitern ¹³⁸ kommt zudem ein hitzelabiler Faktor im Serum gesunder Personen vor, der mit aggregiertem γ -Globulin eine Präzipitationsreaktion ergibt. Vom Komplement soll er sich jedoch durch verschiedene Eigenschaften unterscheiden.

Zur Frage der Antikörpernatur des Rheumafaktors

Es ist vielfach die Auffassung geäußert worden, daß der Rheumafaktor ein Antikörper ist. Wir selbst halten diese Frage noch nicht für endgültig geklärt, obwohl Kunkel ⁶⁷ erst in letzter Zeit wieder nachdrücklich die Antikörpernatur des Rheumafaktors vertrat. Unbestreitbar verhält sich der Rheumafaktor in mancher Hinsicht wie ein Antikörper. Er gehört, wie gezeigt wurde, der β_{2M} -Globulinfraktion an, die verschiedene Antikörper enthält. Bezüglich Sedimentationskoeffizient und Wanderungsgeschwindigkeit in Gelmedien zeigt er ebenfalls ein gleiches Verhalten wie andere Antikörper ⁶⁷. Auch in seinen Antigeneigenschaften verhält er sich wie andere Antikörper. Die Heterogenität des Rheumafaktors bezüglich der Reaktion mit γ -Globulinen verschiedener Spezies ^{114, 12} sowie die molekulare Heterogenität könnte ebenfalls dafür sprechen, daß es sich um einen echten Antikörper handelt ⁶⁷. Mit dieser Annahme wird die

Frage nach dem auslösenden Antigen gestellt, zu deren Beantwortung bisher nur Vermutungen herangezogen wurden.

Durch Immunisierung von Kaninchen bzw. Mäusen, Ratten und Schweinen mit verschiedenen Erregern (β -hämolytische A-Streptokokken, *Corynebacterium pyogenes liquefaciens*, *Corynebacterium diphtheroides*, *Escherichia coli*, Diplostreptokokken der Gruppe B u.a.) konnte nach Bildung von spezifischen Antigen-Antikörperkomplexen ein Faktor erzeugt werden, der sich bezüglich seiner hämagglutinierenden Eigenschaften wie ein Anti- γ -Globulin verhielt ⁹³, 41, 31, 75, 124, 130. Müller ⁹³ teilt anlässlich der Beschreibung seiner Untersuchungen über die Immunisierung von Kaninchen mit β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A mit, daß er einen Faktor erzeugte, der mit Kaninchengammaglobulin präzipitierte und gleichzeitig eine Kreuzreaktion mit menschlichem γ -Globulin ergab. Auch durch Immunisierung von Tieren mit artfremdem Eiweiß ¹³⁹ und durch Zuführung von Antigen-Antikörperkomplexen ² konnte ein wie der Rheumafaktor reagierendes Antigamma-Globulin experimentell erzeugt werden. Diese Modellversuche lassen diskutieren, ob es sich beim Rheumafaktor um einen Antikörper gegen einen Antigen-Antikörperkomplex, in diesem Falle einen Komplex aus bakteriellem Antigen und dem korrespondierenden Antikörper handelt.

In letzter Zeit wurde darüber hinaus die Frage aufgeworfen, ob es sich beim Rheumafaktor um einen Autoantikörper handeln könne. Untersuchungen von Kunkel und Fudenberg ⁶⁹ zur Frage der Spezifität des Rheumafaktors gegenüber patienteneigenem γ -Globulin sowie mit genetisch differenten γ -Globulin-Typen von anderen Individuen haben die Autoren zu dem Schluß kommen lassen, daß sowohl Isospezifität als auch Autospezifität vorkommen können. Auch sind in diesem Zusammenhang Befunde von Milgrom und Witelsky ⁹² interessant, die gezeigt haben, daß durch Immunisierung von Kaninchen mit autologem γ -Globulin Antikörper gegen γ -Globulin des Kaninchens sowie auch des Menschen auftreten können, wobei letztere wohl als Kreuzreaktion aufgefaßt werden müssen. Es ist nicht zu entscheiden, was das autologe γ -Globulin in diesem Falle veranlaßt hat, antigene Eigenschaften anzunehmen, möglicherweise waren es versuchsbedingte Alterationen des γ -Globulin-Moleküls. Dennoch weisen auch diese Versuche den Weg zur Diskussion einer Auto-Antikörperbildung im Zusammenhang mit dem Auftreten des Rheumafaktors.

V o r l a e n d e r ¹⁴⁴ weist darauf hin, daß die Voraussetzung einer Auto-Antikörper-Bildung entweder eine Fremdwerdung oder Fremdepfindung körpereigener Substanzen ist, so daß diese wie Fremdantigene auf die Antikörperbildung wirken. Das kann durch Durchbrechung oder einen Verlust der Immuntoleranz geschehen. Eine Durchbrechung der bereits zur Reifungszeit des Individuums erworbenen Immuntoleranz gegen Eigenantigene kann bei einer Fremdwerdung körpereigener Substanzen infolge Beeinflussung von außen vorliegen. Das könnte bei den oben erwähnten Tierversuchen mit Erzeugung eines Anti-Gammaglobulin-Faktors durch Immunisierung mit den verschiedensten Bakterien der Fall sein. Es ist möglich, daß durch die Antigen-Antikörperkomplexe Strukturveränderungen der γ -Globuline (Antikörper) eintreten ^{103, 104}, die die Fremdepfindung bedingen. Nach V o r l a e n d e r ¹⁴⁴ befriedigt dieser Erklärungsversuch jedoch keineswegs und deutet vor allem nicht die Fälle, in denen die Auto-Antikörperbildung nicht Ursache einer Erkrankung, sondern nur deren Symptom ist, wie es bei der chronischen Polyarthritits der Fall sein dürfte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Durchbrechung der Immuntoleranz bei Berührung von Zellen, Gewebe oder Substanzen mit dem Blutstrom und Kontakt mit den antikörperbildenden Zellen, die normalerweise nicht bestehen ¹⁴⁴. Dies kann theoretisch schon bei entzündlichen Permeabilitätsstörungen der Fall sein. Nach dieser Theorie könnte der Rheumafaktor ein Antikörper gegen Bindegewebssubstanzen sein. Es fand sich jedoch keinerlei Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Rheumafaktors und dem tatsächlichen Nachweis von Auto-Antikörpern gegen bindegewebige Elemente, der im übrigen auch bei rheumafaktor-negativen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gelingt ⁹³.

Die Theorie des Verlustes der Immuntoleranz mit Veränderung der antikörperbildenden Zellen ist eng verknüpft mit der von B u r n e t ¹³ entwickelten Konzeption über die Antikörperbildung. Danach ist nicht das Antigen allein für die Prägung des Antikörpers ausschlaggebend. Eine Zelle des Immunsystems und die aus ihr hervorgehenden Tochterzellen, die als "Klon" bezeichnet werden, besitzen jeweils nur die Fähigkeit zur Bildung eines genetisch determinier-

ten Immunglobulins. Somit kommt dem Antigen nur die auslösende Wirkung für die Bildung des Antikörpers zu, dessen Struktur durch das genetische Material der Zellen bestimmt ist. Die normale Entwicklung der Immuntoleranz gegenüber den physiologischen Antigenen ist nach B u r n e t der Untergang der Zellklone, während der pathologische Verlust der Immuntoleranz durch Fortbestand der Klone infolge Mutation oder genetisch bedingter Abnormität bestimmter zur Antikörperbildung befähigter Zellen verursacht ist. Z i f f ¹⁵² glaubt, daß auch bei der chronischen Polyarthrits nicht ein von außen kommendes Antigen im Sinne einer Auto-Antikörper-Bildung wirksam wird, sondern daß vielmehr eine genetisch bedingte Abnormität der antikörperbildenden Zellen mit Verlust der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen vorliegt.

Es handelt sich bei diesen Überlegungen aber vorläufig lediglich um Theorien, die allerdings manche noch offen stehende Frage beantworten könnten. Es finden sich jedoch keinerlei Anhaltspunkte für eine kausale Beteiligung etwaiger solcher Vorgänge an der Pathogenese der chronischen Polyarthrits. Sie beweisen auch nicht endgültig die Antikörpurnatur des Rheumafaktors überhaupt. Es wurden sogar nicht zu übersehende Einwände gegen die Ansicht erhoben, daß es sich beim Rheumafaktor um einen Antikörper handelt. Üblicherweise können Antikörper durch das Antigen vollständig absorbiert werden. Das soll jedoch beim Rheumafaktor in seiner Bindung an γ -Globulin anscheinend nicht der Fall sein ¹⁴⁵. M ü l l e r ⁹³ glaubt jedoch hierfür die gewählten Versuchsanordnungen verantwortlich machen zu müssen, je nachdem γ -Globulin von Kaninchen oder vom Menschen als Reaktant verwandt wurde. Mit Kaninchen- γ -Globulin soll eine vollständige Absorption nicht möglich sein, wie ein noch beträchtlicher Resttiter im Test mit Rh-sensibilisierten menschlichen Erythrozyten bei einem nur unbedeutenden Resttiter im Test mit Kaninchen-Ambozeptor-beladenen Hammelblutkörperchen zeigt. Dagegen war nach Absorption des Rheumafaktors an menschliches γ -Globulin im Rh-sensibilisierten Erythrozytentest kein Rheumafaktor mehr nachweisbar, bei ebenfalls nur unbedeutendem Resttiter im Waaler-Rose-Test. M ü l l e r ⁹³ schließt daraus auf die Heterogenität des Rheumafaktors, der nur mit den Antikörpermolekülen abgebunden wird, die sich gegen eine dem Originalantigen und dem kreuzreagierenden Antigen gemeinsame Antigeneigenschaft richten. Daher soll eine vollständige Absorption an tierisches γ -Globulin, das nur ein Kreuzantigen darstellt, nicht möglich sein.

Mit diesen Versuchen wären die Zweifel an der Antikörpurnatur des Rheumafaktors wegen einer nicht vollständigen Absorbierbarkeit durch das Antigen weitgehend zu entkräften. Dagegen scheint der Einwand von H e i m e r (zit. ⁶⁷) gegen die Antikörpurnatur des Rheumafaktors mehr Gewicht zu haben, daß Rheumafaktor kein Komplement bindet. Die Tatsache, daß γ -Globulin-beladene Latexpartikel Komplement binden können, aber nur wenn diese keine Bindung an Rheumafaktor eingegangen sind, spricht dafür, daß Rheumafaktor und Komplement die gleiche Stelle am γ -Globulin-Molekül besetzen. Insofern verhält sich der Rheumafaktor wie der inaktive Teil eines Komplements.

Zur Frage der Komplement-Natur des Rheumafaktors

Die letztgenannte Überlegung leitet bereits zur Frage über, ob der Rheumafaktor sich wie Komplement verhält. Nach V a u g h a n ¹⁴⁰ und E d e l m a n n und Mitarbeiter ²⁸ wird der Rheumafaktor wie Komplement an Immunpräzipitate und an bei Antigenüberschuß auftretende lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe absorbiert. Im Gegensatz zu diesen Autoren, die eine Bindungsfähigkeit an Antigen-Antikörper-Komplexe vom Meerschweinchen oder Pferd nicht nachweisen konnten, hat M ü l l e r ⁹³ mit anderer Methodik eine Absorptionsfähigkeit an einen vom Pferd stammenden Antikörper demonstrieren können. Der Haupteinwand gegen die Komplementnatur ist jedoch die Tatsache, daß Rheumafaktor durch Erhitzen für 1 Stunde bei 56°C nicht inaktiviert wird wie Komplement (Komponenten C'₁ und C'₂), sondern nach M ü l l e r ⁹³ bis etwa 62°C bei 30-minütigem Erhitzen und nach unseren, später zu demonstrierenden Untersuchungen bis 66°C bei 10-minütigem Erhitzen aktiv bleibt. Durch Erhitzen werden zwar nur die Komponenten C'₁ und C'₂ inaktiviert, jedoch auch die Inaktivierung der C'₃-Komponente mit Zymosan und der C'₄-Komponente hatte keine Titerverminderung von Rheumatikerserum im sensibilisierten Schafererythrozyten-Test zur Folge ⁷². Im Zusammenhang mit später zu diskutierenden Fragen ist hier die Feststellung wesentlich, daß die C'₁-Komponente eine Sedimentationskonstante von etwa 6,4S und die C'₃-Komponente eine solche von 9,5S besitzt ^{43, 101, 102}. Vermutlich handelt es sich bei der C'₃-Komponente um die Komplement-Komponente, die sich bei immunoelektrophoretischen Untersuchungen als β_{1C} -Linie darstellt und die sich bei Konservierung bzw. Alterung der

Seren in ein β_{14} -Globulin mit der Sedimentationskonstanten von etwa 6,9S umwandelt^{101, 102}.

Schließlich sind noch Untersuchungen von Ellis und Felix-Davies²⁹ sowie Laurell und Grubb⁷² zu erwähnen, nach denen kein Unterschied im Komplement-Titer zwischen Normalseren und Polyarthritisseren sowie insbesondere keine Parallelität zwischen Komplementtiter und Rheumafaktorgehalt bestehen soll. Diese Feststellung dürfte u.E. jedoch nur von Bedeutung sein, wenn man die Bindung des Komplements an Rheumafaktor diskutiert. Es haben aber Perlick¹¹⁰ sowie Geidel und Mitarbeiter⁴⁰ im Gegensatz zu den eben erwähnten Autoren eine solche Erniedrigung des Komplementtiters bei chronischer Polyarthrititis gefunden. Insgesamt betrachtet dürfte die Rolle des Komplements bei der Rheumafaktor- γ -Globulin-Bindung und besonders die etwaige Komplement-Natur des Rheumafaktors noch nicht hinreichend geklärt sein.

Inhibitoren der Rheumafaktor-Reaktion

Hitzelabile Inhibitoren

Schubart¹²¹ sowie Schubart und Mitarbeiter¹²² machten einen hitzelabilen Inhibitor für das bei Ausführung des Latex-Fixationstests mit positivem Rheumatikerserum in niedrigen Verdünnungen häufig auftretende Prozononphänomen verantwortlich. Bei einer nicht unbeträchtlichen Anzahl von Seren, die inaktiviert einen positiven Ausfall des Latex-Fixationstests ergaben, trat bei Verwendung der Seren im nativen Zustand sogar nicht nur ein Prozononphänomen auf, sondern es kam sogar zu einer vollständigen Inhibition. Der Latexfixationstest war also in diesen Fällen mit frischen Seren negativ, obwohl er im inaktivierten Zustand der Seren positiv ausfiel. Bei Erhitzen der Seren für 2 min auf 56°C wird der Inhibitor bereits in seiner Aktivität reduziert und bei Erhitzen über 12-15 min bereits vollständig inaktiviert. Schubart¹²¹ stellte den hitzelabilen Inhibitor auch in Normalseren fest, das dem Rheumatiker-serum zugefügt wurde. In mehreren Fällen verblieb nach Inaktivierung der Normalseren jedoch eine Restinhibition, die der Existenz eines hitzestabilen Inhibitors zugeschrieben wurde, auf den später näher einzugehen ist.

R a n t z und Mitarbeiter ¹¹³ sowie D e i c h e r ²¹ versuchten die Inhibitoren im Eiweißspektrum näher zu lokalisieren. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von frischen Normalseren fanden R a n t z und Mitarbeiter ¹¹³ einen Inhibitor im α - β -Globulin-Bereich, den D e i c h e r ²¹ mit zoneelektrophoretischen Untersuchungen genauer in den α_2 -Globulin-Bereich lokalisierte. Im Latex-Hemmungstest erbrachte diese Fraktion eine deutliche Titerreduktion des Referenzserums. Bei der Euglobulinfraktionierung durch Dialyse gegen Phosphatpuffer (s.o.) vor Auftrennung der Normalseren fand sich der α_2 -Globulin-Inhibitor hauptsächlich im Überstand und in geringerer Menge in der Euglobulinfraktion. Bei Erhitzen der α_2 -Globulin-Fraktion für 30 min auf 56°C war die Inhibitionswirkung vollständig aufgehoben. Damit dürfte es sich hier um den von S c h u b a r t ¹²¹ gefundenen hitzelabilen Inhibitor handeln, der im übrigen in seiner Aktivität bei allen untersuchten Seren sehr konstant war ²¹ und gegenüber dem hitzestabilen γ -Globulin-Inhibitor eine stärkere Potenz aufwies ¹¹³.

S c h u b a r t ¹²¹ glaubt auf Grund seiner Untersuchungen annehmen zu können, daß dieser hitzelabile Inhibitor in Beziehung zum Komplement steht, nachdem bereits die Hitzeinaktivierung erste Anzeichen für diese Annahme bot und außerdem mit dem Verlust der inhibitorischen Potenz gleichzeitig die hämolytische Aktivität der Seren verschwand. Der Autor konnte zeigen, daß der thermolabile Inhibitor durch ein Antigen-Antikörpersystem absorbiert wird, eine Eigenschaft der thermolabilen Komplementkomponenten C'₁ und C'₂. Nach Absorption war die inhibitorische Aktivität des Serums in den meisten Fällen verschwunden. Mit der Annahme der Komplement-Natur des hitzelabilen Inhibitors sind weitere Untersuchungen S c h u b a r t 's ¹²¹ interessant, in denen er bestimmte Komplement-Komponenten isoliert bezüglich ihres Einflusses auf die inhibitorische Wirkung untersuchte. Durch Lösung mit molar 1:200 monobasischer Kaliumphosphatlösung (nach K a b a l und M a y e r, zit. ¹²¹) erhielt er ein Präzipitat, das hauptsächlich die Euglobulin-Fraktion und das sog. "Komplement-Mittelstück" enthält, in dem C'₁, C'₃ und eine kleine Menge C'₄ vorhanden sind, während im Überstand das sog. "Endstück" mit C'₂, C'₄ und wenig C'₃ isoliert werden kann. Nur das Mittelstück (vorwiegend mit den Komplement-Komponenten C'₁

und C'₃) enthielt den Inhibitor, der durch Erhitzen inaktiviert wurde. Auch konnte das Mittelstück an einen Antigen-Antikörper-Komplex absorbiert werden und verlor damit seine inhibitorische Fähigkeit. Die selektive Inaktivierung der Komponente C'₃ mittels Inkubation mit Zymin bei 37°C (nach Whitehead, zit.¹²¹) sowie der Komponente C'₄ mit Ammoniak (nach Kabal und Mayer, zit.¹²¹) ergab nur in einigen Seren eine Reduktion der Inhibitions-Aktivität des Serums, während sonst die Inhibitionsaktivität unbeeinflusst blieb.

Über die Wirkungsweise des hitzelabilen Inhibitors in den Reaktionssystemen ist anscheinend wenig bekannt. Bernhard und Mitarbeiter⁹ nehmen an, daß er sich an die beladenen Latexpartikel, wie übrigens auch Komplement, anlagert. Komplement wurde in seinen Versuchen mit der Komplementtitration an mit elektrophoretisch gewonnenem Human- γ -Globulin beladene Latexpartikel fixiert, nicht dagegen an Human- γ -Globulin in Lösung und auch nicht an mit Albumin beladene Latexpartikel, mit denen bekanntlich auch der Rheumafaktor keine Bindung eingeht. Deicher²¹ nimmt dagegen eine bevorzugte Anlagerung des hitzelabilen Inhibitors an den Rheumafaktor an.

Schließlich ist im Präzipitintest nach Epstein³⁰ nach den Untersuchungen Christian's¹⁵ unaggregiertes γ -Globulin in großem Überschuß in der Lage, die Präzipitation zwischen Rheumafaktor und Cohn-Fraktion II zu hemmen, während in diesem System aggregiertes γ -Globulin natürlich selbst zu Reaktant wird und im Gegensatz zu Testsystemen mit sensibilisierten oder beladenen Erythrocyten oder Kunststoffpartikeln keine Hemmwirkung ausübt. Insofern muß unaggregiertes γ -Globulin in der Präzipitinreaktion als hitzelabiler Inhibitor bezeichnet werden. Der Effekt der Inhibition durch unaggregiertes γ -Globulin kann sich im Präzipitintest darin äußern, daß bei kleinem Reaktionsvolumen das Präzipitat zwischen Rheumafaktor und (unerhitzter) Cohn-Fraktion II mit ihrem relativ geringen Anteil an γ -Globulin-Aggregaten mengenmäßig geringer ist als bei großem Reaktionsvolumen¹⁵. Bei Benutzung von reinem aggregiertem Material durch Unterfraktionierung der Cohn-Fraktion II durch Natriumsulfat tritt eine maximale Präzipitatabildung ein. Christian¹⁵ glaubt, daß die Inhibition im Präzipitintest durch unaggregiertes γ -Globulin gleichbedeutend mit der Bildung von

22S-Komplexen sei. Er nimmt an, daß diese löslichen Komplexe nicht zur Reaktion mit aggregiertem γ -Globulin-Material fähig seien, da das aktive 19S-Globulin jeweils nur eine Reaktion mit 7S-Globulin eingehen könne, entweder die mit Aggregaten und damit Präzipitation bzw. Agglutination oder die mit unaggregiertem γ -Globulin und damit Bildung löslicher 22S-Komplexe. Wir glauben vorläufig nicht, daß diese Ansicht zwingend bewiesen ist, halten es aber doch für möglich, daß unaggregiertes γ -Globulin im Überschuß Rheumafaktor an der Reaktion mit aggregiertem Material in gewissem Ausmaß hindert, da möglicherweise auch ein Gleichgewicht zwischen der Reaktion mit aggregiertem und der mit unaggregiertem γ -Globulin besteht. E p s t e i n (zit. ¹⁵) stellte sogar fest, daß bereits gebildete Präzipitate durch großen Überschuß an γ -Globulin wieder gelöst werden können. Somit stellt ein Überschuß an unaggregiertem γ -Globulin einen Faktor dar, der unter gewissen Umständen als inhibitorische Potenz bei den Rheumafaktor-Reaktionen zu berücksichtigen ist.

Hitzestabile Inhibitoren

H e l l e r und Mitarbeiter ⁵⁹ hatten bereits 1954 mitgeteilt, daß inaktivierte Seren Gesunder die Hämagglutinationsreaktionen des Rheumatikerserums hemmen. Sie vermuteten diesen Inhibitor in der Cohn-Fraktion II des Serums, da diese Fraktion die gleiche inhibitorische Fähigkeit wie das Vollserum besaß. Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ hatten festgestellt, daß sich ein hitzestabiler Inhibitor sowohl in der Euglobulin-Fraktion als auch in deren Überstand befindet. Die Autoren glaubten, daß bei inaktivierten Rheumatikerseren eine inhibitorische Aktivität nur im Überstand enthalten ist, während das Präzipitat lediglich agglutinierende Fähigkeiten aufweist. Auf dieser Überlegung bauten sie ihren bereits erwähnten FII-Test und den Inhibitionstest auf. Zur Durchführung des Inhibitionstestes nach Z i f f wird die Euglobulinfraktion des zu untersuchenden inaktivierten Serums in verschiedenen Verdünnungen einer geeigneten Verdünnung eines bekannt positiven Rheumatikerserums (Referenzserum) zugegeben und die Konzentration bestimmt, in der das zu untersuchende Serum im Vergleich zu inhibitionsaktivem inaktiviertem Normalserum die Agglutinationswirkung des Referenzserums aufhebt. Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ stellten dabei fest, daß auch bei solchen Rheumatikerseren, die im üblichen Hämaggluti-

nationstest (FII-Test) nicht positiv reagierten, höhere Konzentrationen der Euglobulin-Fraktion erforderlich sein konnten, um die Agglutinationsaktivität des Referenzserums aufzuheben. Die Autoren schlossen auf eine verminderte Inhibitoraktivität der Euglobulinfraktion dieser an sich rheumafaktor-negativen Polyarthritikerseren. Von Hall und Mitarbeitern⁵² sowie von uns⁸³ war später der Inhibitionstest mit ähnlichen klinischen Ergebnissen durchgeführt worden.

Christian¹⁵ konnte zeigen, daß im Schafzell-FII-Inhibitions-Test (s.o.) nur aggregiertes γ -Globulin in der Lage ist, eine inhibitorische Wirkung auf die Agglutination auszuüben. Mit Hilfe der bereits erwähnten Natriumsulfat-Trennungsmethode konnte er Unterfraktionen der Cohn-Fraktion II gewinnen, in denen aggregierte und nicht aggregierte γ -Globuline zu trennen waren. Nur die Fraktionen, in denen aggregiertes Material enthalten war, hatten eine deutliche inhibierende Wirkung im FII-Inhibitionstest. Auch gesamte Cohn-Fraktion II hatte, allerdings nur in größerer Menge (entsprechend ihrem Anteil an aggregierten Molekülen), eine Inhibitionswirkung. Nach Edelmann und Mitarbeitern²⁸ inhibiert durch Erhitzen auf 63°C oder Behandlung mit Harnstoff+Mercaptoaethanol alteriertes elektrophoretisch gewonnenes Human- γ -Globulin wie Cohn-Fraktion II die Agglutination mit Rheumatikerserum im sensibilisierten Schafzell-Agglutinationstest. Schon "unerhitzte" Cohn-Fraktion II hatte eine nicht unerhebliche inhibitorische Wirkung, die durch Erhitzen auf 63°C noch verstärkt wurde. Nach Christian¹⁵ könnte der Fraktionierungsvorgang zur Gewinnung der Cohn-Fraktion II, in dessen Verlauf das Ausgangsmaterial inaktiviert werden dürfte, ausreichen, um eine Anzahl Aggregate zu bilden, die eine inhibitorische Wirkung im FII-Inhibitionstest ausüben. Auch scheint sich damit unsere, auf Grund der später zu beschreibenden eigenen Untersuchungen gebildete Annahme zu bestätigen, daß im Ziff'schen Inhibitionstest der mit der Euglobulinfraktion inaktiverter Seren ausgeführt wurde, ein "hitzestabiler Inhibitor" im eigentlichen Sinne nicht vorliegt, sondern erst bei der Erhitzung des Serums durch Aggregation von γ -Globulin entsteht. Eine weitere Folgerung daraus wäre, daß im Inhibitionstest mit inaktiverter Euglobulin-Fraktion aggregiertes γ -Globulin mit Rheumafaktor im zu untersuchenden Serum (wie im Präzipitintest) reagiert und daher nicht mehr inhibitorisch auf die Agglutinationswirkung des Referenzserums zur Verfügung

steht. Auch Franklin und Mitarbeiter³⁸, die eine ähnliche Meinung vertreten, glauben, daß durch den Vorgang der Euglobulinpräzipitation allein schon ein Teil des niedermolekularen γ -Globulins aggregiert. Somit wurden geringe Rheumafaktormengen nachgewiesen, die im üblichen Agglutinationstest noch nicht positiv reagieren.

Ein solches Verhalten kommt auch in den Untersuchungsergebnissen von Deicher²¹ zum Ausdruck, der bei elektrophoretischer Serumauftrennung im γ_2 -Globulinbereich einen Inhibitor fand, der nur nach Erhitzen des frischen Serums für 30 min auf 56°C wirksam im Sinne einer Titerreduktion eines Referenzserums ist, dagegen nicht in der gleichen Fraktion des frischen Serums. Dieser "Inhibitor" war auch als "Reaktant" brauchbar. Neben diesem Faktor glaubt Deicher²¹ jedoch, noch einen weiteren Inhibitor im $\gamma_1(-\beta_2)$ -Globulin-Bereich gefunden zu haben, der in verschiedenen Seren unterschiedlich, also mit individuell sehr abweichender Menge, auftritt und dessen inhibitorische Wirkung sich durch Erhitzen des frischen Serums für 30 min auf 56°C wesentlich verstärkt. Der Autor weist auf das ähnliche Verhalten dieses Faktors gegenüber aggregierter Cohn-Fraktion II hin. In der Immunelektrophorese wurde er als 7S- γ -Globulin identifiziert. Er nimmt an, daß es sich um aggregiertes γ -Globulin handelt. Auffallenderweise fand Deicher²¹ sowohl die hitzeaggregierte Cohn-Fraktion II als auch den hitzeaggregierten γ_1 -Globulin-Inhibitor als Reaktant nicht geeignet. Er glaubt daher, den γ_1 -Globulin-Inhibitor vom Reaktant streng trennen zu können, während Rantz und Mitarbeiter¹¹³, die ebenfalls einen γ -Globulin-Bereich liegenden Inhibitor beschrieben, jedoch eine Identität mit Reaktant annahmen. In jedem Falle geht aber die Meinung dahin, daß es sich beim hitzestabilen Inhibitor um γ -Globulin-Aggregate handeln muß, die vermutlich bei der Aufbereitung der Seren entstehen. Jedenfalls haben Edelmann und Mitarbeiter²⁸ gefunden, daß nicht-aggregiertes (mit der Ultrazentrifuge gewonnenes) γ -Globulin keinen inhibitorischen Effekt im Schafzell-Agglutinationstest aufweist. Das zeigt, daß auch der von Deicher²¹ aus Nativserum elektrophoretisch gewonnene hitzestabile Inhibitor bereits Aggregate sein müssen, wie das Deicher auch bereits selbst annimmt. Insofern stellt auch der γ_1 -Globulin-Inhibitor Deicher's letztlich Reaktant

dar. Im übrigen fand D e i c h e r ²¹ den hitzestabilen γ_1 -Inhibitor größtenteils in der Euglobulinfraktion und zu einem geringeren Anteil im Überstand.

Auch elektrophoretisch gewonnenes Kaninchen- γ -Globulin inhibiert nach E d e l m a n n und Mitarbeitern ²⁸ im mit Kaninchen-Ambozeptor sensibilisierten Schafzell-Agglutinationstest, und zwar schon im nicht erhitzten Zustand. Die Autoren stellten fest, daß auch Präparationen, die nur unaggregiertes 7S-Globulin enthielten, bereits eine Inhibition verursachen. Sie sehen im Sinne einer Spezies-Spezifität eine gewisse Parallele im Verhalten beim Agglutinationssystem der mit menschlichen Rh-Antikörpern beladenen Erythrozyten, wobei nach V a u g h a n und W a l l e r ¹⁴² ebenfalls menschliche γ -Globuline mit niedrigem Molekulargewicht eine inhibitorische Aktivität aufweisen können.

Auf die Bedeutung des in das letztgenannte Problem bereits hineinspielenden Gm(a+)-Inhibitors wurde bereits hingewiesen. Er hat nur Bedeutung im Agglutinationssystem der mit Rh-Antikörpern beladenen Rh-positiven Erythrozyten. Die Inhibitionseigenschaft menschlicher Seren in diesem Agglutinationssystem, die als Gm(a+) bezeichnet wird, ist gegen den Rheumafaktor mit der Gruppeneigenschaft Anti-Gm(a) gerichtet (Literatur s.o.).

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Untersuchungen über die Thermostabilität von Rheumafaktor und Reaktant

Da wir uns in späteren Versuchen bemühten, eine Abspregung des Rheumafaktors von der Bindung an γ -Globulin-beladene Latexpartikel durch Erhitzen auf bestimmte Temperaturen zu erreichen, war eine Untersuchung der Hitzeempfindlichkeit sowohl des Rheumafaktors als auch der γ -Globuline der Cohn-Fraktion II bzw. ihrer Bindung an die Latexpartikel zweckmäßig.

Untersuchungsmaterial, Reagentien und apparative Ausrüstung

- a) Hochtitriges Rheumatikerserum
- b) Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latexpartikel (0,81 μ), handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles)
- c) Glycine-Saline-Pufferlösung pH 8,2 (handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles)
- d) Objektträger, an der Unterseite schwarz lackiert
- e) Wasserbad mit Thermostat und Umwälzer.

Versuchsreihe 1 (Hitzeeinfluß auf die Aktivität des Rheumafaktors)

Methodik und Versuchsanordnung

Insgesamt 10 Portionen des gleichen Rheumatikerserums (a) wurden 10 Minuten im Wasserbad (e) auf unterschiedliche Temperaturen (60°, 62°, 64°, 66°, 68°, 70°, 72°, 74°, 76°, 78°) erhitzt und wieder abgekühlt. Daneben wurde eine Probe bei Zimmertemperatur gehalten und nicht der Erwärmung im Wasserbad ausgesetzt, so daß insgesamt 11 Proben untersucht wurden. Von jeder Probe wurden 0,05 ml entnommen und mit 1 ml Pufferlösung (c) im Reagensglas versetzt, wodurch eine Serumverdünnung von 1:20 entstand. Von dieser Verdünnung wurden je 0,05 ml auf einen geschwärzten Objektträger (d) gebracht, 0,05 ml Latexsuspension (b) hinzugegeben, mit einem Glasstab verrührt und nach 2-3 min unter vorsichtigen Kippbewegungen der Agglutinationsgrad abgelesen. Die Bewertung erfolgte nach der Skala $\emptyset$, (+), +, ++, +++.

Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 1 (obere Reihe)

dargestellt. Sie besagen, daß der Agglutinationsgrad des Rheumafaktors im Latextropfentest geringer wird, wenn das Rheumatikerserum vor der Durchführung der Bestimmung für 10 min einer Erhitzung auf 68°C ausgesetzt worden war. Nach einer Erhitzung für 10 min auf 70°C ist die gesamte Aktivität des Rheumafaktors verschwunden. Eine Erhitzung für 10 min auf 66°C beeinträchtigt dagegen die latexagglutinierende Wirkung nicht. Der Rheumafaktor ist damit bis 66°C bei 10-minütiger Erhitzung sicher hitzestabil.

Versuchsreihe 2 (Hitzeeinfluß auf die Suspension γ -Globulinbeladener Latexpartikel)

Methodik und Versuchsanordnung

Insgesamt 12 Röhrchen mit Latexsuspension (b) wurden im Wasserbad (e) 10 Minuten auf unterschiedliche Temperaturen (60°, 62°, 64°, 66°, 68°, 70°, 72°, 74°, 76°, 78°, 80°, 82°) erhitzt und wieder abgekühlt. Zusätzlich wurde 1 Röhrchen nicht erhitzt und als Vergleichsröhrchen betrachtet. Sowohl im Reagensglas als auch mit der Lupe auf dem geschwärzten Objektträger (d) wurden die einzelnen Proben hinsichtlich der Gleichmäßigkeit der Suspension betrachtet.

Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei einer Erhitzung der Latexsuspension für 10 min auf 78°C verliert diese ihre Eigenschaft als gleichmäßige Suspension. Vermutlich durch die Denaturierung des γ -Globulins bzw. Störung der γ -Globulin-Latexbindung erscheint eine mit höherer Temperatur zunehmende "Konglomeration". Bei einer Erhitzung für 10 min auf 76°C bleibt dagegen die gleichmäßige Suspension erhalten.

Versuchsreihe 3 (Beeinflussung der Latexagglutination durch Erhitzen der Latexsuspension)

Methodik und Versuchsanordnung

Insgesamt 12 Röhrchen mit Latexsuspension (b) werden im Wasserbad (e) 10 Minuten auf unterschiedliche Temperaturen (wie in Versuchsreihe 2) erhitzt. Daneben wurde ein 13. Röhrchen bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde mit hochtitrigem Rheumatikerserum insgesamt 13mal der Latextropfentest mit Titerbestimmungen wie in Versuchsreihe 1 durchgeführt, wobei als Latexsuspension jeweils eine der

Agglutination im Latextropfentest (Serumverdünnung 1:20) nach vorheriger Erhitzung des Rheumatikerserums bzw. der Latexsuspension auf		Kon- trolle	60°	62°	64°	66°	68°	70°	72°	74°	76°	78°	80°	82°
Erhitzter Reaktions- teilnehmer														
Rheumatikerserum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	ø	ø	ø	ø	ø		
Latex-γ-Globulin- Suspension	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	[+]	[+++]	[+++]

T a b e l l e 1

Agglutination der Latexpartikel im Latextropfentest unter Einwirkung von Rheumatikerserum nach Erhitzen des Rheumatikerserums bzw. der Latex-Suspension auf verschiedene Temperaturen

"Konglomeration" der Latexpartikel nach Erhitzen der Latexsuspension auf		Kon- trolle	60°	62°	64°	66°	68°	70°	72°	74°	76°	78°	80°	82°
"Konglomeration" der Latexsuspension	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	+	++	+++

T a b e l l e 2

Konglomeration der Latexpartikel durch Erhitzen der Latexsuspension

13 Proben, die bis auf das Kontrollröhrchen der Erhitzung auf verschiedene Temperaturen ausgesetzt worden waren, verwandt wurde.

Besprechung der Ergebnisse

In Tabelle 1 (untere Reihe) finden sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Ein Latextropfentest mit Rheumatikerserum ist noch ausführbar, wenn vorher die Latexsuspension für 10 min auf 72°C erhitzt worden war. Bei 74°C zeigt sich eine Abnahme des Agglutinationsgrades, und bei 76°C (10 min) tritt bereits gering, bei höheren Temperaturen zunehmend die bereits beschriebene "Konglomeration" auf, die eine Agglutinationsbeobachtung unmöglich macht. Damit ist die Latex- γ -Globulin-Suspension bei einer Erhitzung bis zu 72°C als hitzeunempfindlich zu bezeichnen. Diese Voruntersuchungen erscheinen für die beabsichtigte Absprengung des Rheumafaktors von der Bindung an den Reaktant wesentlich.

Untersuchungen von Vollserum und Serumfraktionen mit dem Latexagglutinationstest

Im Zusammenhang mit dem Problem der Lokalisation des Rheumafaktors bzw. auch der Inhibitoren in bestimmten Serumfraktionen sollen auch unsere diesbezüglichen Ergebnisse mitgeteilt werden. Es wurden dabei bewußt Untersuchungsmethoden herangezogen, die auch in mittleren und kleineren Laboratorien durchführbar sind, da eine etwa mögliche Erhöhung der Trefferquote und Verringerung der falsch positiven Ergebnisse in der klinischen Diagnostik nur dann wertvoll erscheinen, wenn die Methoden auch ohne großen Aufwand angewandt werden können. Als Modifikation des Agglutinationstestes wurde deshalb der Latextropfentest herangezogen, der sich hinsichtlich der Treffer- und Fehlerquote als vollkommen ausreichend und vollwertig erwiesen hatte 79, 80, 84, 82, 91, 89, 78. Da in der hier vorgelegten Arbeit die Diskussion über Reaktionsweise und Natur des Rheumafaktors im Vordergrund steht, soll auf die ausführliche Darstellung der von uns erzielten Treffer- und Fehlerquote 79, 84, 82 verzichtet werden. Die hier geschilderten Untersuchungen beziehen sich auf die Fragestellung der etwaigen Unterschiede der Ergebnisse, die mit einigen Serumfraktionen im Gegensatz zu Vollserum als Ausgangsmaterial bei Durchführung des Latextropfentestes erzielt werden. Im Falle des Kältepräzipitates wurde zusätzlich auch der Überstand, dessen Aufbereitung allerdings in kleineren Laboratorien Schwierigkeiten bereitet, bezüglich seiner Rheumafaktoraktivität untersucht. Diese Untersuchung geschah im Hinblick auf die von S v a r t z und S c h l o s s m a n n 137, 136 mitgeteilten Ergebnisse, daß Unterschiede in der Lokalisation latexagglutinierender Faktoren dahingehend bestehen, daß sich der Rheumafaktor vorwiegend im Kältepräzipitat findet, während andere Anti- γ -Globuline in erster Linie im Überstand lokalisiert sein sollen.

Untersuchungsmaterialien, Reagentien und apparative Ausrüstung

- a) inaktivierte Seren von Patienten mit sicherer chronischer Polyarthritis (Bewertung nach den Kriterien der American Rheumatism Association)
- b) inaktivierte Seren von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen außer chronischer Polyarthritis

- c) inaktivierte Seren von Patienten mit Leberleiden
- d) inaktivierte Seren von klinisch gesunden Blutspendern
- e) Suspension mit γ -Globulin beladener Latexpartikel, handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles
- f) Suspension mit γ -Globulin beladener Latexpartikel, handelsübliches Reagens der Behring-Werke, Marburg
- g) Glycine-Saline-Puffer pH 8,2, handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles
- h) Glykokoll-NaCl-Puffer pH 8,2, handelsübliches Reagens der Behring-Werke, Marburg
- i) 0,0027 n Salzsäure
- k) Ammoniumsulfatlösung: 193 g Ammoniumsulfat, 40 g Natriumchlorid, 1000 g Aqua dest.
 - l) Aqua dest. von + 4°C
- m) physiologische NaCl-Lösung
- n) 0,85%ige NaCl-Lösung
- o) 0,45%ige NaCl-Lösung
- p) Kältezentrifuge
- q) Gefriertrocknungsanlage

Methodiken

- 1) Latex-Tropfentest (Methodik bei G u m und S m i t h ⁵¹⁾)
- 0,05 ml des zu untersuchenden inaktivierten Serums (a, b, c, oder d) bzw. der Serumfraktion wurden zu 1 ml Pufferlösung (g bzw. h) gegeben, wodurch eine Anfangsverdünnung von 1:20 entsteht. Bei den Kältepräzipitatuntersuchungen wurde eine geometrische Verdünnungsreihe bis 1:1280 angesetzt. Von jeder Verdünnung (bei den Untersuchungen mit Salzsäure- und Ammoniumsulfat-Fällung nur in der Verdünnung 1:20) wurden 0,05 ml auf einen geschwärzten Objektträger gegeben und mit 0,05 ml der betreffenden Latexsuspension (e bzw. f) vermischt. Bei den Untersuchungen der Salzsäure- und Ammoniumsulfat-Fraktion wurden die Reagentien der Behring-Werke (f, h), bei den Versuchen mit Kältepräzipitat und dessen Überstand die Reagentien der Hyland Laboratories (e, g) angewandt. Nach 3 Minuten unter vorsichtigen Kippbewegungen wird die Agglutination abgelesen.

2) Globulin-Fraktionierung (gering modifiziert nach V a u g h n
u. Mitarb. 141)

1 ml des zu untersuchenden inaktivierten Serums (a, b, c bzw. d) werden mit 9 ml 0,0027 Salzsäure (i) versetzt und 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wird der Rückstand in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung (m) entsprechend der ursprünglichen Serummenge gelöst.

3) Globulin-Fraktionierung (modifiziert nach W o l f s o n
u. Mitarb. 150)

9,6 ml Ammoniumsulfatlösung (k) werden mit 0,4 ml des zu untersuchenden inaktivierten Serums (a, b, c bzw. d) überschichtet, 2 min vorsichtig vermischt und 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird das Sediment in 0,4 ml physiologischer NaCl-Lösung (m) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

4) Kältepräzipitation (gering modifiziert nach S v a r t z und
S c h l o s s m a n n 136)

Das zu untersuchende inaktivierte Serum (a, b, c bzw. d) wird im Verhältnis 1:15 (0,5 mg Serum auf 7 ml Aqua dest.) mit Aqua dest. von + 4°C versetzt und 48 Stunden im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt. Dann wird 30 min bei 3000 U/min in der Kältezentrifuge (p). Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und weiter verarbeitet (s.u.). Das Zentrifugat wurde mit 0,5 ml einer 0,85%igen NaCl-Lösung (n) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

5) Überstand des Kältepräzipitates

Der dekantierte, bei der Kältepräzipitation anfallende Überstand (s.o.), wird durch Gefriertrocknung (q) lyophilisiert und anschließend in 0,5 ml 0,45%iger NaCl-Lösung (o) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Versuchsreihe 1

Es wurden die Vollseren von Patienten mit klinisch sicherer chronischer Polyarthrititis, mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises außer chronischer Polyarthrititis (Arthrosis deformans, degenerative Wirbelsäulenerkrankungen, Periarthritis humero-scapularis, Arthritis

psoriatica, metastatische Arthritis, subakute Polyarthritits), mit Lebererkrankungen (akute Hepatitis, Lebercirrhose, Stauungsleber und chronischer Hepatopathie auf dem Boden chronischer Cholecystopathien) sowie von gesunden Blutspendern im Latex-Tropfentest mit den Reagentien der Behring-Werke (f, h) untersucht. Bei einer Serumverdünnung von 1:20 wurde die negative, positive oder fraglich positive Agglutination der Latexpartikel bewertet. Vergleichend zu Vollserum haben wir die Untersuchungen mit Serumfraktionen vorgenommen, die durch oben genannte Fällungen mit Salzsäure (Methodik 2) bzw. Ammoniumsulfat (Methodik 3) erhalten wurden. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 verzeichnet.

Versuchsreihe 2

An den gleichen Seren wie in Versuchsreihe 1 wurden Untersuchungen mit Vollserum im Vergleich zum Kältepräzipitat (Methodik 4) und dessen Überstand (Methodik 5) durchgeführt. In dieser Versuchsreihe haben wir auch Titerbestimmungen vorgenommen, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit bezüglich der Aktivität in den beiden Fraktionen zu erzielen. Die Bestimmungen des Latex-Tropfentestes wurden in diesem Fall mit den Reagentien der Hyland Laboratories (e, g) vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 1 enthalten.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigen, daß durch die angewandten Fraktionierungen des Serums durch pH-Verschiebung oder Salzfällung die Trefferquote im Latextropfentest, allerdings bei einer Auswahl von nur 14 Patienten mit klinisch sicherer chronischer Polyarthritits, nicht erhöht wurde (Tabelle 3). Die Untersuchung wurde mit den handelsüblichen Reagentien der Behring-Werke durchgeführt. Wir können diesbezüglich auf eine frühere vergleichende Untersuchung an weiteren 30 Fällen hinweisen, in der sogar eine geringere Trefferquote bei Verwendung der Salzsäurefällung gegenüber den Vollseren als Ausgangsmaterial erzielt wurde ⁸⁴. Damit bieten diese Fraktionierungsmöglichkeiten keinen Vorteil hinsichtlich einer größeren Ausbeute positiver Ergebnisse. Auch zeigen sie wohl keine "Anreicherung" des Rheumafaktors

Diagnose	n	Vollserum		Salzsäure-Fällung		Ammon. Sulfat-Fällung	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Chronische Poly-arthritis	14	11	3	11	3	11 ⁺	3
Rheumat. Erkrank. außer chron. Polyarthr.	14	1	13	0	14	1	13
akute Hepatitis	8	1	7	1	7	0	8
Leberzirrhose	18	5	13	4	14	3	15
Stauungsleber Verschlusikt. Chron. Hepatopathie	18	5	13	5	13	5	13
gesamt	44	11	33	10	34	8	36
Gesunde (Kontrolle)	75	2	73	2	73	2 ⁺⁺	73

+ davon 1 Fall nur fraglich positiv; ++ beide Fälle nur fraglich positiv

T a b e l l e 3

Treffer- und Fehlerquote im Latex-Tropfentest mit Reagentien der Behring-Werke bei Verwendung von Vollserum und zwei Serumfraktionen als Ausgangsmaterial bei Polyarthritikern, Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen, Patienten mit Lebererkrankungen und bei Gesunden

Diagnose	n	Vollserum		Kältepräzipitat		Überstand	
		pos.	fragl.pos.	pos.	fragl.pos.	pos.	fragl.pos.
Chronische Polyarthrit	14	11	0	3	10	3	1
Rheumat. Erkrank. außer chron. Polyarthr.	14	0	0	14	0	2	12
Lebererkrankungen	akute Hepatitis	8	1	0	7	1	0
	Leberzirrhose	18	6	1	11	5	2
	Stauungsleber Verschl. Chron. Hepatopathie	18	6	0	12	4	10
gesamt	44	13	1	30	10	6	28
Gesunde (Kontrolle)	75	2	2	71	2	5	68
						0	1
							74

Tabelle 4

Ausfall der Reaktion im Latex-Tropfentest mit Reagentien der Hyland Laboratories bei Polyarthritikern, Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen, Patienten mit Lebererkrankungen und bei Gesunden. Vergleich zwischen Vollserum, Kältepräzipitat und dessen Überstand.

in den genannten Fraktionen und geben somit keinen besonderen Hinweis auf die Lokalisation des Rheumafaktors im Eiweißspektrum. Auch die Quote an falsch positiven Ergebnissen, die bei 75 gesunden Blutspendern ermittelt wurde, zeigte keine Verringerung. Die zwei im Vollserum positiven Fälle waren auch in den Fraktionen (bei der Ammoniumsulfat-Fällungsmethode jedoch nur fraglich) positiv. Die bei Lebererkrankungen vorkommenden Anti- γ -Globulin-Faktoren lassen sich vielleicht in den genannten Fraktionen, besonders bei der Ammoniumsulfatfällung, gegenüber dem Vollserum in etwas geringerem Prozentsatz, aber sicher nicht mit signifikantem Unterschied nachweisen.

Die Untersuchungen des Kältepräzipitates und seines Überstandes (Tabelle 4) ergaben kein wesentlich anderes Bild. Auch hier wurde die Trefferquote bei chronischen Polyarthritikern nicht erhöht, wenn man nicht zwei der im Vollserum negativen Fälle, die im Kältepräzipitat fraglich positiv wurden, als wesentlichen Zuwachs an positiven Ergebnissen anerkennen will, wobei allerdings noch zu berücksichtigen ist, daß einmal ein deutlich positiver Fall nur noch fraglich positiv wurde. Auch konnte die positive Reaktion bei Lebererkrankungen nicht durch die Verwendung des Kältepräzipitates als Ausgangsmaterial eindeutig vermindert werden. Hier verringert sich zwar die Zahl der deutlich positiven Agglutinationen (10 gegenüber 13), jedoch vermehrt sich die Anzahl der fraglich positiven Ausfälle um mehr, als es der Abnahme der deutlich positiven Ergebnisse entsprach. Unter Einbeziehung der fraglich positiven Ausfälle vermehrten sich auch die falsch positiven Ergebnisse bei Gesunden und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen außer Polyarthrititis. Es ist also zusammenfassend zu sagen, daß eine Lokalisation des Rheumafaktors in Kältepräzipitat oder Überstand und besonders auch eine Separation gegenüber dem bei Lebererkrankungen vermutlich auftretenden Anti- γ -Globulin auch durch die Kältepräzipitation nicht annähernd möglich ist.

Die vergleichende Betrachtung von Kältepräzipitat und Überstand erfolgt am besten an Hand der Abbildung 1, auf der die Titer in beiden Fraktionen für jeden Fall gesondert aufgetragen sind. Es sind nur die Fälle aufgeführt, die ein positives Ergebnis mindestens in einer der beiden Fraktionen (Kältepräzipitat, Überstand) oder im Vollserum

Gesunde und
andere rheumat.
Erkrankungen
(außer c.P.)

(n=89)

Voll-serum

1: 20
1: 40
1: 80
1: 160
1: 320

Leber-
erkrankungen

(n=44)

Voll-serum

1: 20
1: 40
1: 80
1: 160
1: 320
1: 640

Chronische
Polyarthritis

(n=14)

Voll-serum

1: 20
1: 40
1: 80
1: 160
1: 320
1: 640

640 320 160 80 40 20 0 1: 20 40 80 160 320 640
Kältepräzipitat Überstand

Abbildung 1

Vergleich der Titerstufen zwischen Vollserum, Kältepräzipitat und dessen Überstand im Latextropfentest. Es sind nur die Fälle verzeichnet, die in einem der Ausgangsmaterialien ein positives Ergebnis zeigten. (- - - = fraglich positiv; n = Gesamtzahl in den einzelnen Gruppen).

aufwiesen. Die übrigen Fälle, die durch Subtraktion von der angegebenen Gesamtzahl "n" der Gruppe zu erhalten sind, hatten in allen drei Ausgangsmaterialien ein negatives Ergebnis. Wir kamen zu dem gleichen Resultat wie M i c h e l i und Mitarbeiter ⁸⁸, die feststellten, daß sich bei Anwendung des Schaferythrozyten-Agglutinationstestes bei der chronischen Polyarthrits die Aktivität im Allgemeinen mehr im Überstand des Kältepräzipitates befindet. Vor allem kann wohl nicht davon gesprochen werden, daß im Kältepräzipitat eine Anreicherung des Rheumafaktors stattfindet, wie das S v a r t z und S c h l o s s m a n n ^{137, 136} annahmen. Auch ist eine prinzipielle Unterscheidung des Anti- γ -Globulins bei Lebererkrankungen vom Rheumafaktor bezüglich seines Vorkommens im Kältepräzipitat oder Überstand nicht möglich. Das Gleiche hatten auch schon M i c h e l i und Mitarbeiter ⁸⁸ für den Lupus erythematoses festgestellt. Auffallend war in unseren Ergebnissen, daß fast alle, bei Gesunden und rheumatischen Erkrankungen außer chronischer Polyarthrits vorhandenen falsch positiven (vorwiegend schwach und fraglich positiven) Ergebnisse fast nur im Kältepräzipitat gefunden wurden, auch dann, wenn das Vollserum ein negatives Ergebnis zeigte. Das gilt auch für die Fälle von Lebererkrankungen und chronischer Polyarthrits, die bei negativem Ausfall der Agglutinationsreaktion im Vollserum bei der Kältepräzipitation positiv wurden. Man könnte also meinen, daß schwach positive, im Vollserum nicht sichtbare Ausfälle bei der Kältepräzipitation vor allem im Präzipitat auftreten, während bereits im Vollserum vorhandene Agglutinationen mit Ausnahmen sowohl im Präzipitat als auch im Überstand, und vor allem dann im Überstand stärker als im Präzipitat, wiedergefunden werden. Da dieses aber nicht nur für Polyarthritiker sondern auch für die falsch positiven Ergebnisse gilt, bringt die Kältepräzipitation keinen methodischen Vorteil im Zusammenhang mit dem Latextropfentest. Für die Fragestellung dieser Arbeit bedeutet das, daß bezüglich der Lokalisation des Rheumafaktors im Eiweißspektrum die Kältepräzipitation des Serums keine Aussage ermöglicht.

Entwicklung einer Methode zur Isolierung des Rheumafaktors

Voraussetzung für das Studium der Natur des Rheumafaktors ist seine möglichst reine Darstellung. Um dieses Ziel zu erreichen, mußte versucht werden, den Faktor, der sich an γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) bindet, von dieser Bindung wieder auszusprengen, ohne daß der Rheumafaktor seine Fähigkeit, mit Reaktant zu reagieren, einbüßt. Wir haben eine Methode entwickelt, mit der es gelingt, durch Erhitzen auf bestimmte Temperaturen diese Abspaltung vorzunehmen und damit den Faktor zu gewinnen, der die pathologische Eigenschaft der Anti- γ -Globuline, sich an γ -Globulin zu binden, aufweist.

Untersuchungsmaterial, Reagentien und apparative Ausrüstung

- a) Hochtitriges rheumafaktor-positives Rheumatikerserum (RS)
- b) Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latexpartikel (handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles) (LyGS)
- c) Glycine-Saline-Pufferlösung pH 8,2 (handelsübliches Reagens der Hyland Laboratories, Los Angeles) (PL)
- d) Wasserbad mit Thermostat und Umwälzer
- e) Zentrifuge mit wärmeisolierten vorgewärmten Einsätzen nach eigener Anfertigung. Als Isolierungsmaterial wurde Styropor verwendet. Die Abkühlung der Zentrifugationsflüssigkeit darf dabei innerhalb von 5 min und 1500 U/min nicht mehr als 1°C betragen.

Methodik

1 Teil eines hochtitrigen Rheumatikerserums (RS) wurde mit 10 Teilen Glycine-Saline-Pufferlösung (PL) und 10 Teilen einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln (LyGS) in ein Zentrifugenglas zusammengegeben und nach Schütteln 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 7 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgehoben und verworfen. Man kann den Überstand vor dem Verwerfen im Agglutinationstest einer Titerbestimmung unterwerfen, um den nach Bindung des Rheumafaktors an die beladenen Latexpartikel verbleibenden Resttiter festzustellen. Der Bodensatz wurde mehrfach mit eiskalter PL gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang unter Berücksichtigung eines Materialverlustes von etwa

25% in PL von $\frac{3}{4}$ des Ausgangsvolumens suspendiert und bei $63-65^{\circ}\text{C}$ unter mehrmaligem Aufschütteln im Wasserbad für 10-12 min erhitzt. Sofort anschließend wurde bei $63-65^{\circ}\text{C}$ 3 min bei 1500 U/min, später bei 20000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort noch in der Wärme abgehoben und enthielt den von der γ -Globulin-Bindung wieder abgesprengten RF. Durch den Agglutinationstest kann der nur geringe, aber bei verschiedenen Isolierungsversuchen unterschiedliche, Titerverlust gegenüber dem Ausgangsmaterial festgestellt werden. Als günstiges Mischungsverhältnis hat sich, wie in dieser Methodik angegeben, die Relation 1 Teil RS : 10 Teilen PL : 10 Teilen LyGS erwiesen. Es wurden ferner noch Untersuchungen mit geänder-tem Mischungsverhältnis durchgeführt, von denen beispielsweise hier zwei Versuchsreihen angegeben werden, und zwar die anteilmäßige Vermehrung der LyGS (1 Teil RS : 2 Teilen PL : 40 Teilen LyGS) oder des RS (1 Teil RS : 5 Teilen PL : 5 Teilen LyGS). Schließlich wurden die Temperaturen verändert, um den Temperaturbereich festzustellen. in dem die beschriebene Absprengung erfolgt.

Versuchsreihe 1 (Standardversuch zur RF-Isolierung)

Versuchsanordnung

Es wurde nach der oben angegebenen Methodik vorgegangen. Das Mischungsverhältnis betrug 0,2 ml eines RS (mit einem Titer von 1:2560) : 2 ml PL : 2 ml LyGS, die Absprengungstemperatur 65°C . Im Agglutinationstest wurde der Titer des sog. "ersten Überstandes" (verbliebener Resttiter im RS nach Bindung des RF an die beladenen Latexpartikel) und des sog. "letzten Überstandes" (Titer in PL nach Absprengung des RF von den beladenen Latexpartikeln) im Latextropfentest ermittelt.

Besprechung der Ergebnisse

Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 5 aufgezeichnet. Es zeigte sich, daß es mit der beschriebenen Methodik gelingt, den an γ -Globulin-beladene Latexpartikel gebundenen Rheumafaktor abzusprengen und so den Reaktor in Pufferlösung für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Das in dieser Untersuchung verwendete Mischungsverhältnis von RS : PL : LyGS von 1:10:10 sowie eine Absprengungstemperatur von 65°C erwiesen sich damit als günstig.

Versuchsreihe 2 (Änderung des Mischungsverhältnisses)

Versuchsanordnung

Es wurde einmal anteilmäßig die LyGS (0,05 ml RS : 1 ml PL : 2 ml LyGS) und zum anderen das RS (0,4 ml RS : 2 ml PL : 2 ml LyGS) vermehrt, um zu erfahren, ob möglicherweise andere Mischungsverhältnisse eine günstigere Ausbeute an isoliertem RF-Material ergeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 enthalten.

Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen ergaben, daß eine Änderung des Mischungsverhältnisses eine geringere Ausbeute an isoliertem Material ergab.

Versuchsreihe 3 (Änderung der Absprengungstemperatur)

Versuchsanordnung

Um den Temperaturbereich festzustellen, in dem eine Absprengung des Rheumafaktors vonstatten geht, wurde die Methodik der Versuchsreihe 1 insofern abgewandelt, daß in einzelnen Versuchen unterschiedliche Absprengungstemperaturen angewandt wurden. Entsprechend unseren Feststellungen über die Hitzestabilität des Rheumafaktors, die nur bis etwa 66°C gegeben ist, wurden Temperaturen von 65°C abwärts untersucht. Die jeweilige Ausbeute an Rheumafaktor wurde durch Titerbestimmungen des "letzten Überstandes" im Vergleich zum Titer des Ausgangsmaterials im Latex-Tropfentest festgestellt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 7.

Besprechung der Ergebnisse

Die Absprengung des Rheumafaktors erfolgt bei einer Temperatur von über 60°C, während bei 59°C kein Rheumafaktor im letzten Überstand gefunden wurde. Temperaturen über 65°C wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen, da über 66°C die Denaturation des Rheumafaktors einsetzt.

Versuchsreihe 4 (Absprengungsversuch mit verschiedenen Seren)

Versuchsanordnung

Nachdem sich erwiesen hatte, daß das in Versuchsreihe 1 gewählte Mischungsverhältnis der Ausgangsmaterialien bezüglich einer größtmöglichen Ausbeute an isoliertem RF-Material günstig ist und im

Versuchs- anordnung	untersuchtes Material	Agglutinationsgrad bei einer Verdünnung von									
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
Standard- versuch 1 RS : 10 PL : 10 LyGS	Serumtitler	+++	+++	+++	++	++	++	+	(+)	ø	
	erster Überstand	+++	++	++	+	+	(+)	ø	ø	ø	
	letzter Überstand	+++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	ø	

T a b e l l e 5

Agglutinationsgrad im Latextropfentest bei verschiedenen Verdünnungen des "ersten Überstandes" und "letzten Überstandes" im Vergleich zum Serumtitler beim Standardversuch (Versuchsreihe 1)

Versuchs- anordnung	untersuchtes Material	Agglutinationsgrad bei einer Verdünnung von									
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
1 RS : 2 PL : 40 LyGS	Serumtitler	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	ø
	erster Überstand	+	(+)	(+)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
	letzter Überstand		++	++	+	+	+	(+)	(+)	ø	
1 RS : 5 PL : 5 LyGS	Serumtitler	+++	+++	+++	+++	++	++	++	(+)	(+)	ø
	erster Überstand	+++	+++	++	++	+	(+)	(+)	ø	ø	ø
	letzter Überstand	++	++	+	+	(+)	(+)	ø	ø	ø	

T a b e l l e 6

Agglutinationsgrad im Latextropfentest bei verschiedenen Verdünnungen des "ersten Überstandes" und "letzten Überstandes" im Vergleich zum Serumtitler bei Änderung des Mischungsverhältnisses (Versuchsreihe 2)

Temperaturbereich von 60-65°C eine Absprengung erfolgt, wurde für alle folgenden Isolierungen von RF-Material, das zur Gewinnung von Antiserum diente und für die folgenden immunologischen Arbeiten benötigt wurde, das Mischungsverhältnis von 1 Teil RS : 10 Teilen PL : 10 Teilen LyGS und eine Absprengungstemperatur von 63°C angewandt. Je nach der Menge des benötigten Isolierungsmaterials wurde die Menge des RS, der LyGS und der PL bei gleichbleibendem Verhältnis vervielfacht. In Tabelle 8 sind die Titerergebnisse im letzten Überstand, also die jeweilige Ausbeute an isoliertem Material, gegenüber dem Serum-Ausgangstiter bei Verarbeitung mehrerer Seren angegeben. Im späteren Verlauf der Untersuchungen wurde wegen der Kostbarkeit des mengenmäßig geringen Materials (hohe Kosten der Reagentien) der Endtiter nicht mehr bestimmt, da seine genaue Angabe für die immunologischen Untersuchungen unerheblich ist. Wir können deshalb hier nur einige Beispiele für die erreichte Ausbeute geben.

Besprechung der Ergebnisse

Auch bei genauer Einhaltung der Versuchsanordnung ist die Ausbeute bei Verwendung verschiedener Seren nicht immer konstant in seinem Verhältnis des Titers zu dem des Ausgangsmaterials. Das bedeutet, daß nicht bekannte Faktoren die Ausbeute nicht unmaßgeblich beeinflussen können. Vielleicht spielen Raumtemperaturen, Abweichungen der Reagentien, geringe Unterschiede der Zentrifugationsgeschwindigkeiten und nicht zuletzt Faktoren der verwendeten Seren hier eine Rolle.

Versuchsreihe 5 (Untersuchungen zur Reversibilität der Rheumafaktorabsprengung)

Versuchsanordnung

Schließlich sollte demonstriert werden, wie sich der "letzte Überstand" bezüglich des Titers des isolierten Materials verhält, wenn er nicht sofort nach der Zentrifugation noch in der Wärme abgehoben wird. Es wurde deshalb im Doppelversuch einmal der letzte Überstand sofort in der Wärme abgehoben, zum anderen jedoch nach Aufschütteln zunächst für 30 min bei 37°C in den Brutschrank verbracht. Nach erneuter Zentrifugation bei 37°C wurde dann der Überstand abgehoben und titriert. Schließlich wurde die Probe, bei der der Überstand noch in der Wärme abgehoben wurde, in drei Proben unterteilt. Bei

Absprengungs- temperatur	Serum-Aus- gangstiter	Titer des isolierten Materials in Pufferlösung
65°C	1:320	1:160
63°C	1:320	1:160
60°C	1:320	1:160
59°C	1:320	∅

T a b e l l e 7

Untersuchung verschiedener Temperaturen bezüglich der Möglichkeit, Rheumafaktor von der γ -Globulin-Latex-Bindung abzusprengen am Beispiel eines Serums mit einem Ausgangstiter von 1:320 (Versuchsreihe 3)

Serum Nr.	Serum-Aus- gangstiter	Titer des isolierten Materials in Pufferlösung
1	1:5120	1:1280
2	1:2560	1:2560
3	1:2560	1:1280
4	1:2560	1:1280
5	1:1280	1:1280
6	1:1280	1:640
7	1:1280	1:640
8	1:1280	1:320
9	1:640	1:160
10	1:320	1:160
11	1:320	1:80

T a b e l l e 8

Ausbeute an isoliertem Rheumafaktor-Material in Pufferlösung (gleiches Volumen wie Serum vor Absprengung) am Beispiel verschiedener Seren und Isolierungsversuche (Versuchsreihe 4)

Serum-Aus- gangstiter	T i t e r d e s i s o l i e r t e n M a t e r i a l s in der Wärme (62° - 63°C) abgehoben			
	sofort titriert	nach Abkühlung titriert	n. 14 Tg. -20°C titriert	nach Abkühlung abgeh. u. titr.
1:1280	1:640	1:640	1:640	∅

T a b e l l e 9

Reversibilität der Rheumafaktorabsprengung und Kältebeständigkeit des isolierten Materials (Versuchsreihe 5)

einer wurde sofort der Agglutinationstiter bestimmt, die zweite wurde im Brutschrank auf 37°C abgekühlt, während die dritte eingefroren und nach 14 Tagen wieder aufgetaut wurde. Erst dann wurde der Agglutinationstiter im Latextropfentest bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 9.

Besprechung der Ergebnisse

Es zeigte sich, wie zu erwarten, daß sich der zunächst im Überstand befindliche Rheumafaktor nach Abkühlung wieder an die beladenen Latexpartikel anlagert. Es ist deshalb erforderlich, den Überstand sofort in der Wärme abzuheben, wenn man keinen Titerverlust des isolierten Materials riskieren will. Wird der Überstand aber noch in der Wärme abgehoben, kann man ihn abkühlen lassen oder auch einfrieren und aufbewahren, ohne daß ein Titerverlust auftritt.

Gewinnung eines Rheumafaktor-Antiserums

Für immunologische Untersuchungen mit dem nach oben beschriebener Methodik isolierten Rheumafaktor schien der Versuch einer Gewinnung eines Rheumafaktor-Antiserums lohnend.

Material und Methodik

Als Antigenmaterial zur Immunisierung von insgesamt 4 Kaninchen wurde nach oben beschriebener Methodik isolierter Rheumafaktor 1:20 in Pufferlösung mit einer Rheumafaktor-Aktivität von 1:1280 im Latextropfentest verwandt. Die Aufarbeitung erfolgte unter weitgehend sterilen Bedingungen. Die Injektionen wurden intravenös vorgenommen. Das Immunisierungsschema war folgendes: Erstimmunisierung: 1. Tag 0,5 ml; 3. Tag 1,0 ml; 6. Tag 1,5 ml; 9. Tag 1,5 ml; 12. Tag 1,5 ml; Nachimmunisierung: 42. Tag 1,0 ml; 45. Tag 2,0 ml; 48. Tag 2,0 ml. Blutabnahmen erfolgten bei einem Tier am 8., 21. und 51. Tag, bei 2 Tieren nur am 51. Tag. Ein Tier verloren wir durch eine Infektion, bei diesem erfolgte eine Blutabnahme deshalb nur am 8. Tag.

Versuchsergebnisse

Daß die Gewinnung von Rheumafaktor-Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen mit isoliertem Rheumafaktor gelungen ist, wird in späteren Versuchen gezeigt werden, in denen die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen aufgeführt sind. Es kann vorweggenommen werden, daß bei Blutabnahme am 51. Tag nach Immunisierungsbeginn die Immunisierung als vollständig bezeichnet werden kann, während das Antikörpermateriel am 8. und 21. Tag noch ungenügend war. Die in Abbildung 8-9 gezeigten Präparate einer immunologischen Untersuchung mit der Doppeldiffusionstechnik nach Cuchterlony beweisen die gelungene Gewinnung des Antiserums durch eine Darstellung von Präzipitationslinien des Rheumafaktor-Antiserums gegen ein Normalserum und ein Rheumatikerserum nach Vollimmunisierung (ARF_{1c} = Entnahme am 51. Tag), nicht oder nur angedeutet dagegen nach unvollständiger Immunisierung (ARF_{1a} = Entnahme am 8. Tag; ARF_{1b} = Entnahme am 21. Tag). Auf die Bedeutung der erzielten Präzipitationslinien selbst wird später eingegangen werden.

Immunologische Untersuchungen mit Rheumatikerserum,
isoliertem Rheumafaktor und Antirheumafaktorserum

Zur Bestätigung vorliegender Befunde und zur weiteren Aufklärung noch offenstehender Fragen wurden umfangreichere Untersuchungen mit der Immunelektrophorese und der Agardiffusionstechnik nach Ouchterlony durchgeführt.

Materialien, Reagentien und apparative Ausrüstung

- a) Rheumafaktorpositive, hochtitrige Polyarthritikerseren (RS)
- b) Normalseren von gesunden Blutspendern (gepoolt) (NS)
- c) isolierter Rheumafaktor (RF) nach oben angegebener eigener Methodik; pro Ansatz 0,8 ml Rheumatikerserum, 8 ml Glycine-Saline-Pufferlösung (Hyland Laboratories), 10 ml Suspension mit γ -Globulin beladener Latexpartikel (Hyland Laboratories). Es wurde somit pro Ansatz 6 ml Rheumafaktor enthaltende Pufferlösung gewonnen, die durch Dialyse gegen Aqua dest. und Kieselgel von den Puffersubstanzen weitgehend gereinigt und auf etwa 1/12, in einigen Versuchen bis auf etwa 1/120, der Ausgangsmenge eingeengt wurde.
- d) Anti-Rheumafaktor-Serum, gewonnen nach oben angegebener eigener Methodik (ARF)
- e) Anti-Voll-Humanserum (Ziege bzw. Pferd) der Hyland Laboratories (AHS)
- f) γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) der Hyland Laboratories (CF II)
- g) Anti- β_2 -Makroglobulin-Serum (Ziege) der Hyland-Laboratories (AB_{2M})
- h) Anti- γ -Globulin-Serum (Ziege) der Hyland Laboratories (A7S)
- i) Anti-Cohn-Fraktion II (γ -Globulin) (Kaninchen) Hyland Laboratories (ACF II)
- k) Anti- α_{2M} -Globulin-Serum (Ziege) der Hyland Laboratories (Ad_{2M})
- l) Anti- β_{2A} -Globulin (Ziege) der Hyland Laboratories (AB_{2A})
- m) Anti-Transferrin (Kaninchen) der Behring-Werke
- n) Reinagar der Behring-Werke für Immunelektrophorese und Gel-Diffusionsteste
- o) Veronal-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0,1 für Agargel (Veronal 1,66; Veronal-Natrium 10,51; Calcium-Laktat 1,536; Aqua bidest. ad 1000 ml)
- p) Veronal-Puffer pH 8,6 für Elektrophorese (Veronal 6,9; Veronal-natrium 42,8; Calcium-Laktat 1,92; Aqua bidest. ad 5000 ml)

- q) Fixierlösung: 2%ige Essigsäurelösung
- r) Amidoschwarz-Lösung (Amidoschwarz 10 B 1,0, Acetatpuffer 850 ml (s.u.); Glycerin p. a. 150 ml
- s) Acetatpuffer für Amidoschwarz-Lösung (r): Essigsäure (60 ml ad 1000 ml Aqua dest.) und Na-acetat-Lösung (13,6 g Na-acetat $\text{3H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua dest.) zu gleichen Teilen.
- t) Entfärber: 2%ige Essigsäure
- u) Phosphatpufferlösung 0,15 molar pH 7,1 (6,72 g K_2PO_4 ; 26,8 g Na_2HPO_4 ad 1000 ml Aqua dest.)
- v) Cialit, Asid-Institut München als Bacterio- und Mycostaticum
- w) Immunelektrophorese-Gerät Agafor 1, Egaton A.G., Bern.

Methodiken

1) Immunelektrophorese

Die immunelektrophoretischen Untersuchungen wurden in der Mikromethodik nach S c h e i d e g g e r ¹¹⁷ mit geringer Modifikation durchgeführt. Es wurde 1,2%iger Agar verwandt, der durch Zugabe von 1,2 g Reinagar (n) zu 66,5 ml Veronalpuffer (o) und 33,5 ml Aqua dest. sowie 0,01 g Cialit (v) hergestellt und bis zur Verflüssigung erwärmt wurde. Mit je 2,5 ml flüssigen Agars wurden fettfreie Objektträger (26 x 76 mm) beschickt. Nach Erstarrung erfolgte Ausstanzen der Antigen- und Antikörperlager mit speziell angefertigten Stanzen. Nach Einfüllen der zu untersuchenden Antigene in die Antigenlager erfolgte Einlegen in die Immunelektrophoresekammer (w) unter Verwendung von Veronalpuffer (p) und Anlegen einer Spannung von 6 Volt/cm bei einer Auftrennungszeit von 45 min. Danach wurden die Antiseren in das Antikörperlager eingefüllt und das Präparat für 16-18 Stunden in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur gehalten. Nach Bildung der Präzipitationslinien wurden die Präparate 24 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die mit feuchtem Filtrierpapier bedeckten Objektträger wurden im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde nach Entfernung des Filtrierpapiers 5 min mit Essigsäure (q) fixiert, 10-20 Minuten mit Amidoschwarz gefärbt und nach Entfärbung in Essigsäure (t) getrocknet.

2) Doppeldiffusionsmethode im Agar-Gel

Diese Untersuchungen wurden modifiziert nach O u c h t e r l o n y ¹⁰⁷

vorgenommen. Es wurde 0,8%iger Agar verwandt, der durch Zugabe von 0,8 g Reinaragar (n) zu 50 ml Aqua dest. und einem Gemisch von 33,2 ml Phosphatpuffer (u) und 16,8 ml Aqua dest. sowie 0,01 g Cialit (v) hergestellt und bis zur Verflüssigung erwärmt wurde. Je 20 ml flüssigen Agars wurden auf in Petrischalen (8 cm Durchmesser) befindliche fettfreie Objektträger (50 x 50 mm) gegossen. Nach Erstarren erfolgte Ausstanzen der Antigen- bzw. Antikörperlager (Durchmesser 8 mm, Abstand 8 mm) mittels spezialangefertigter Stanze. Nach Einfüllen der betreffenden Antigen- bzw. Antikörper-Lösungen bzw. -Seren wurden die Schalen geschlossen 48 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend die Objektträger mit der überstehenden Agarschicht aus den Schalen entnommen. Waschen, Trocknen und Färben der Präparate erfolgte in gleicher Weise wie bei der Immunelektrophorese (Methodik 1), nur wurde die Waschzeit auf 48 Stunden verlängert.

3) Doppeldiffusions-Mikrotechnik im Agar-Gel

Zur semiquantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Versuchsreihe 2) wurde 0,75%iger Agar verwandt. 0,75 g Agar (n) wurde mit 0,01 g Cialit (v) in 50 ml Aqua bidest. bis zur Verflüssigung erwärmt, ein vorerwärmtes Gemisch von 33,2 ml Phosphatpuffer (u) und 16,8 ml Aqua bidest. zugegeben und nochmals bis zur vollständigen Verflüssigung erwärmt. Vorerwärmte, fettfreie Objektträger (26 x 76 mm) wurden mit 2 ml des 0,75%igen Agars beschickt und nach Erkalten in feuchter Kammer 5 Lochgruppen zu je 6 Löchern pro Objektträger mittels Spezialstanze (Eigenanfertigung) eingestantzt. Diese Antigen- bzw. Antikörperlager hatten einen Durchmesser von 2 mm und einen Abstand von 4 mm. Nach Einfüllen der Antikörper-Lösungen bzw. Antigene (Seren) verblieben die Präparate in feuchter Kammer unter gelegentlichem Nachfeuchten für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Dann erfolgte Waschen in physiologischer Kochsalzlösung für 24 Stunden und anschließendes Trocknen unter Filterpapier bei 37°C. Nach 5 min Fixierung in Essigsäure (q) wurde 48 Stunden mit Amidoschwarz (r) gefärbt und danach für 1/2 Stunde mit Essigsäure (t) entfärbt. Schließlich wurden die Präparate unter Leitungswasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Versuchsreihe 1

Es sollten zunächst in immunelektrophoretischen Untersuchungen von

43 Seren von Patienten mit sicherer chronischer Polyarthritits (Diagnosestellung nach den Kriterien der American Rheumatism Association) Unterschiede im Auftreten der Präzipitationslinien gegenüber Normalseren festgestellt werden. Dabei waren insbesondere Veränderungen zu berücksichtigen, die im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit stehen.

Versuchsordnung

Dieser Versuchsreihe liegt die Methodik 1 zugrunde. Als Antigene wurden unverdünntes Normalmischserum und unverdünntes Rheumatikerserum eingefüllt. Als Antiserum wurde Anti-Vollhumanserum (e) vom Pferd (1 ml Anti-Serum + 0,75 ml Aqua dest.) verwandt, wodurch eine bessere Darstellung der für uns wesentlichen β_{2M} -, β_{2A} - und β_{1A-C} -Linien vergleichsweise zu unverdünntem Antiserum vom Pferd oder Antiserum vom Kaninchen erzielt wurde.

Besprechung der Ergebnisse

In Abbildung 2 wird eine Großaufnahme als Beispiel der insgesamt 43 Vergleichsuntersuchungen zwischen Normalserum und Rheumatikerserum gebracht, die die Bedeutung der Präzipitationslinien durch nähere Bezeichnungen besser demonstriert. Die Gegenüberstellung der Präzipitationslinien von Rheumatikerserum und Normalserum im gleichen Präparat erlaubt nach Heremans⁶² eine halbquantitative Aussage unter Berücksichtigung folgender Kriterien: 1) Je höher die Antigenkonzentration ist, desto näher liegt die Präzipitationslinie am Antikörperreservoir. 2) In einem größeren Radius der Präzipitationskurve zeigt sich eine stärkere Konzentration. 3) Trübungszonen finden sich auf der Seite eines Überschusses. 4) Die Stärke der Linien ist von optimalen Konzentrationsverhältnissen abhängig und daher nur im Zusammenhang mit anderen Kriterien verwertbar.

Nach diesen Gesichtspunkten wurden die Präparate der 43 Polyarthritikerseren bezüglich der etwaigen Vermehrung bestimmter Proteinfractionen ausgewertet. In Tabelle 10 ist die Anzahl der Fälle und der Prozentsatz am gesamten Krankengut angegeben, bei dem die einzelnen Fraktionen vermehrt gefunden wurden. Eine Beurteilung der bereits bekannten Albuminverminderung und γ -Globulin-Vermehrung wurde nicht vorgenommen, da diese sich mit der üblichen Papier-

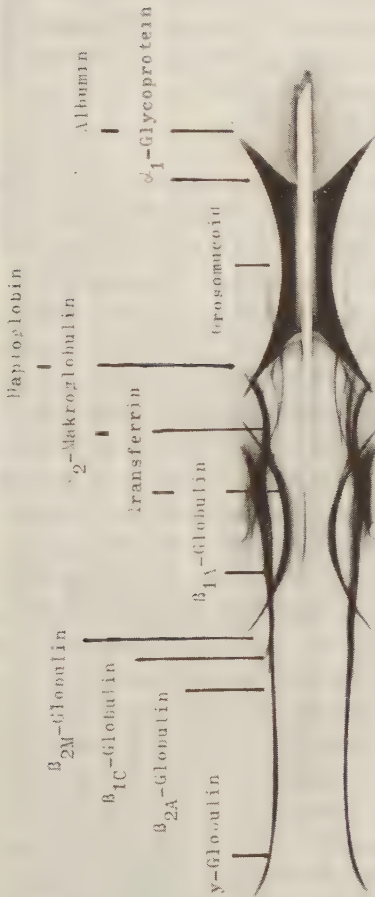


Abbildung 2

Beispiel einer Immunelektrophorese eines Rheumatikerserums im Vergleich zu einem gepoolten Normalserum. Antigenlager oben: Rheumatiker serum, unten: Normalserum; Antikörperlager: Antihuman-Serum. Es sind im Wesentlichen nur die Präzipitationslinien näher bezeichnet, die im Rahmen der Arbeit von Bedeutung sind und ausgewertet wurden.

755 Kohn/Levine

elektrophorese besser erfassen lassen.

Es ist in Anbetracht der Problemstellung nicht auf die Bedeutung aller Proteinvermehrungen im einzelnen einzugehen. Sie sind teilweise Ausdruck der Krankheitsaktivität schlechthin bzw. spiegeln die lokalen Gewebsvorgänge wieder. Im übrigen stimmen die Befunde der Haptogloblinvermehrungen (55,8% der Fälle) mit unseren früheren Untersuchungen⁸⁶ überein, nach denen bei titrimetrischer Bestimmung unter Zugrundelegung eines 90%-Toleranzbereiches 57,8% der Polyarthritiker eine Haptoglobinspiegelerhöhung zeigten.

In unserer Fragestellung interessierten in erster Linie die Verhältnisse des β_2 -Makroglobulins, in dessen Fraktion der Rheumafaktor zu suchen ist. Wir haben deshalb bei der halbquantitativen Auswertung der β_{2M} -Globulin-Vermehrungen diese in drei Grade eingeteilt (Abbildung 3), was bei den deutlichen Zunahmen unter Berücksichtigung der erwähnten Kriterien von Heremans⁶² erlaubt erschien. Diesen Graden des β_{2M} -Globulin-Gehaltes, die mit "normal", "leicht vermehrt" und "deutlich vermehrt" bezeichnet wurden (Abbildung 3), wurden die Agglutinationsgrade ($\emptyset$, (+), +, ++, +++) im Latextropfentest bei einer Serumverdünnung von 1:20 gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt. Es zeigt sich, daß keine Parallelität zwischen der β_2 -Makroglobulinvermehrung und dem Agglutinationsgrad im Latextropfentest, der mit Vorbehalt als Maß für den Gehalt des Serums an Rheumafaktor angesehen werden kann, besteht. Insbesondere fand sich auch in einem Fall von chronischer Polyarthritits, in dem kein Rheumafaktor nachgewiesen wurde, eine β_{2M} -Globulin-Vermehrung, wie sie übrigens auch bei Normalseren beobachtet werden kann. Dieser Befund würde darauf hindeuten, daß eine β_2 -Makroglobulinvermehrung nicht oder nicht allein auf das Vorhandensein des Rheumafaktors zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, daß bei der allgemeinen Globulinvermehrung beim Rheumatiker der Rheumafaktor nicht allein das Ausmaß der β_2 -Makroglobulinvermehrung bestimmt. Außerdem ist es möglich, daß das β_2 -Makroglobulin des Rheumafaktors nicht unbedingt eine Bildung neuen Globulins bedeutet, sondern aus dem üblichen β_2 -Makroglobulin stammt, wobei das Protein jedoch seinen Charakter in bestimmter Weise ändert.

Aus später noch zu erläuterndem Grunde interessierte ferner das Verhalten des β_{1A-C} -Globulin-Komplexes in Polyarthritikerseren. In

	Orosomucoid	α_1 -Glykoprotein	α_2 -Makroglobulin	Haptoglobulin	β_{2A} -Globulin	γ_x -Globulin	β_{1A-C} -Globulin-Komplex	β_2 -Makroglobulin
Zahl d. Fälle	26	22	38	24	24	11	30	28
% der Fälle	60,5	51,2	88,4	55,8	55,8	25,6	69,8	65,1

Tabelle 10

Anzahl und prozentualer Anteil der insgesamt 43 Seren von Patienten mit klinisch sicherer chronischer Polyarthrit, bei der eine Vermehrung verschiedener Proteinfractionen gefunden wurde

Aggl.-Grad im LTT	n	β_{2M} -Globulin deutlich vermehrt Fälle	β_{2M} -Globulin leicht vermehrt Fälle	β_{2M} -Globulin normal Fälle
+++	9	0	5	4
++	17	7	4	6
+	10	4	2	4
(+)	6	2	3	1
$\emptyset$	1	1	0	0
Sa.	43	14	14	15

Tabelle 11

Beziehung zwischen β_2 -Makroglobulin in der Immunelektrophorese und Agglutinationsgrad im Latextropfentest (LTT) bei einer Serumverdünnung von 1:20

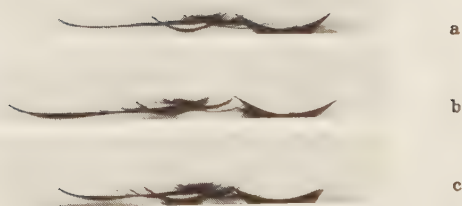


Abbildung 3

Semiquantitative Beurteilung der β_2 -Makroglobulin-Präzipitationslinie in immunoelektrophoretischen Präparaten.

a = β_2 M-Globulin normal, b = β_2 M-Globulin leicht vermehrt,

c = β_2 M-Globulin deutlich vermehrt.

Tabelle 10 wurde bereits gezeigt, daß in 69,8% der Fälle eine β_{1A-C} -Vermehrung bei unseren 43 untersuchten Polyarthritikern gefunden wurde. Dabei wurde zunächst der β_{1A-C} -Globulin-Komplex insgesamt betrachtet. Es zeigte sich nun, daß die β_{1C} -Globulin-Präzipitationslinie allein auftreten kann oder zusätzlich eine mehr oder weniger ausgeprägte β_{1A} -Globulin-Linie sichtbar wird, zu der die β_{1C} -Globulin-Linie eine Verbindung besitzt. In Tabelle 12 sind die Befunde bei 35 Seren hinsichtlich des Verhaltens der Präzipitationslinien des β_{1A-C} -Komplexes zusammengefaßt dargestellt. Der β_{1A-C} -Globulin-Komplex soll nach Müller - Eberhard¹⁰², wie bereits erwähnt, mit der C'_3 -Komponente des Komplements in Beziehung stehen, wobei das Auftreten einer β_{1A} -Globulin-Linie einer Komplementinaktivierung entsprechen soll. Da wir bei unseren bisherigen immunologischen Untersuchungen bei Rheumatikerseren gegenüber Normalseren auffallend häufig keine isolierte β_{1C} -Globulin-Linie sondern eine Verbindung zu einer β_{1A} -Globulin-Linie sahen, war es im Zusammenhang mit der Frage der Komplementaktivität interessant, Rheumatikerseren und Normalseren zum gleichen Zeitpunkt nach Blutentnahme vergleichend zu untersuchen. Abbildung 4a zeigt einen solchen Vergleich bei Verarbeitung des Serums 2 Stunden nach Blutentnahme. In Tabelle 13 haben wir eine Auswertung von 16 Normalseren und 11 Rheumatikerseren hinsichtlich des Verhaltens der Präzipitationslinien des β_{1A-C} -Globulin-Komplexes vorgenommen. Die Aufstellung zeigt, daß in relativ frischen Normalseren in der Mehrzahl die β_{1C} -Globulin-Linie isoliert zu finden ist, während bei Rheumatiker-Seren die Tendenz zur zusätzlichen Ausprägung einer β_{1A} -Globulin-Linie besteht und isolierte β_{1C} -Globulin-Linien in keinem Falle vorkamen. In Abbildung 4b wurde die Umwandlung des β_{1A-C} -Globulin-Komplexes in seiner Abhängigkeit von der Alterung des Serums demonstriert. Insgesamt lassen unsere, allerdings erst an einer relativ kleinen Fallzahl gewonnenen und deshalb mit Vorbehalt zu beurteilenden Ergebnisse vermuten, daß bei Polyarthritiden ein vermehrter Komplementverbrauch gegenüber Gesunden vorliegt, wie er auch von Perlick¹¹⁰ sowie Geidel und Mitarbeitern⁴⁰ im Gegensatz zu den Mitteilungen anderer Autoren^{29, 72} beschrieben wird.

n	B ₁ C isoliert		B ₁ C mit schwachem B ₁ A		B ₁ C mit deutlichem B ₁ A	
	Fälle	%	Fälle	%	Fälle	%
35	5	14,3	10	28,6	20	57,2

T a b e l l e 12

Verhalten des B_{1A}-C-Globulin-Komplexes bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung von 35 Polyarthritikerseren

Seren	Zeit nach Blut-entnahme	n	B ₁ C isol. Fälle	B ₁ C mit schw. B ₁ A Fälle	B ₁ C mit deutl. B ₁ A Fälle	B ₁ A isol. Fälle
Gesunde	2 Std.	10	8	2	0	0
Polyarthritiker	2 Std.	11	0	3	8	0

T a b e l l e 13

Vergleich des B_{1A}-C-Globulin-Komplexes bei Seren von Gesunden und Polyarthritikern zu gleicher Zeit nach der Blutentnahme (die Zeitangaben beziehen sich auf das Ansetzen der Immunelektrophorese)



Abbildung 4a

Immunelektrophoretische Vergleichsuntersuchung eines Normalserums (oben) gegenüber einem Rheumatikerserum (unten) 2 Std. nach Blutentnahme. Das Normalserum zeigt eine alleinige β_1C -Globulin-Linie, Rheumatikerserum eine β_1C -Linie mit Verbindung zu einer β_1A -Globulin-Linie.

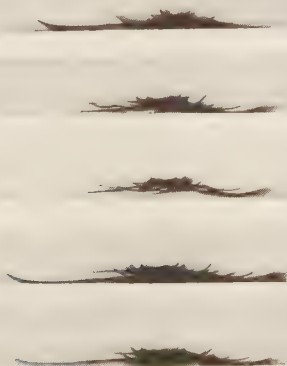


Abbildung 4b

Einfluß des Zeitabstandes der Serumverarbeitung nach Blutentnahme auf die Präzipitationslinie des β_1A -C-Globulin-Komplexes. Aufbewahrung des Serums bei Zimmertemperatur im Zeitraum von 2-48 Stunden.

Versuchsreihe 2

Da in den immunoelektrophoretischen Untersuchungen der Versuchsreihe 1 eine Vermehrung der β_2 -Makroglobuline deutlich wurde, sollte versucht werden, diese mit einer weiteren semiquantitativen immunologischen Methode zu bestätigen.

Versuchsanordnung

Es wurde den Versuchen die oben angegebene Methode 3 (Doppeldiffusions-Mikrotechnik im Agar-Gel) zugrundegelegt. Untersucht wurden insgesamt 34 Normalseren (Blutspenderseren) und 36 Seren von Patienten mit klinisch gesicherter chronischer Polyarthritits (Kriterien der American Rheumatism Association), davon 34 Normalseren und 35 Rheumatikerseren bezüglich der β_2 -Makroglobulin-Serumkonzentrationen und vergleichsweise 28 Normalseren und 36 Rheumatikerseren hinsichtlich der α_2 -Makroglobulin-Serumkonzentration. Die zu untersuchenden Seren (Normalseren und Polyarthritikerseren) wurden in Verdünnungsreihen (mit Aqua bidest.), beginnend mit 1:11, in die jeweils 5 äußeren Antigenlager einer Lochgruppe eingebracht. In das in der Mitte gelegene Antikörperlager wurde unverdünntes Anti- β_{2M} -Serum bzw. Anti- α_{2M} -Serum mittels Mikropipette eingefüllt. Bei der schrittweise steigenden Verdünnung der zu untersuchenden Seren von 1:11, 1:12 usw. wurde die Verdünnung ermittelt, bei der eine Präzipitationslinie erstmals nicht mehr auftrat.

Besprechung der Ergebnisse

Die gefundenen Einzelwerte sind in den Abbildungen 5 und 6, aufgliedert nach dem Agglutinationsgrad der betreffenden Seren im Latex-Tropfentest aufgezeichnet. In den Abbildungen sind auch die statistisch errechneten Mittelwerte mit den zugehörigen Streubreiten eingetragen. Die Ergebnisse zeigen, daß hinsichtlich des β_2 -Makroglobulin-Gehaltes der Polyarthritikerseren gegenüber den Gesunden wohl ein höherer Mittelwert besteht, der jedoch nicht vom Agglutinationsgrad im Latextropfentest abhängig ist. Zudem ist die Anzahl der Fälle nicht unerheblich, die bei stark positivem Latex-Test einen normalen Gehalt des Serums an β_2 -Makroglobulin aufweisen, soweit man diesen Schluß aus der semiquantitativen Bestimmung ziehen kann.

Die vergleichsweise Bestimmung der α_2 -Makroglobuline, die mit Sicher-

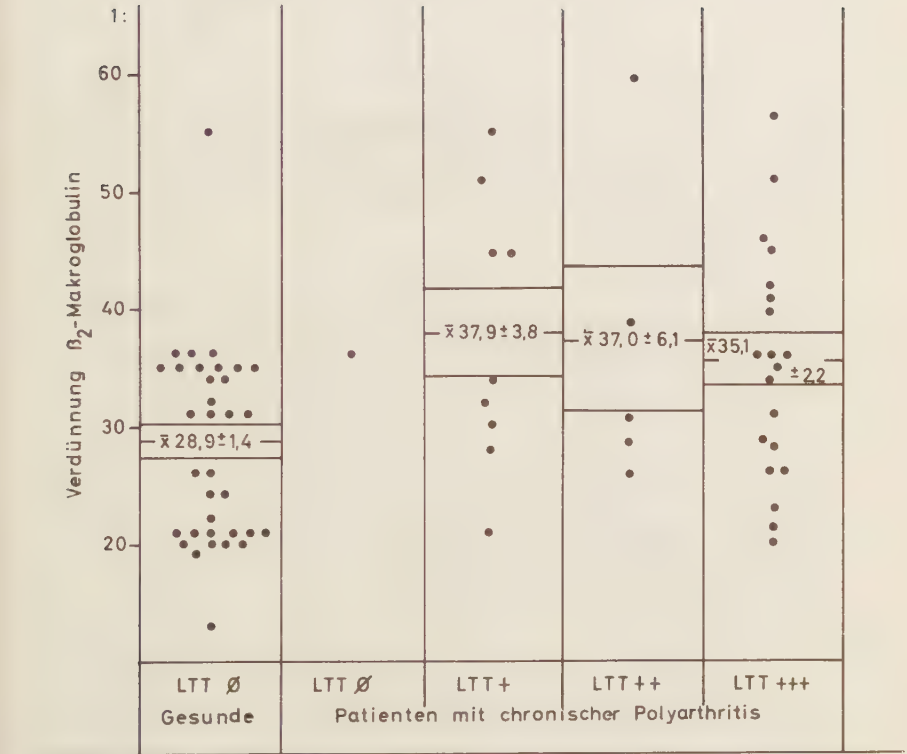


Abbildung 5

Erforderliche Verdünnung der Seren von Gesunden und Polyarthritikern, bei der gegen Anti- β_2 -Serum keine Präzipitationslinie mehr auftritt, aufgegliedert nach dem Agglutinationsgrad im Latextropfentest (LTT) bei einer Serumverdünnung von 1:20.

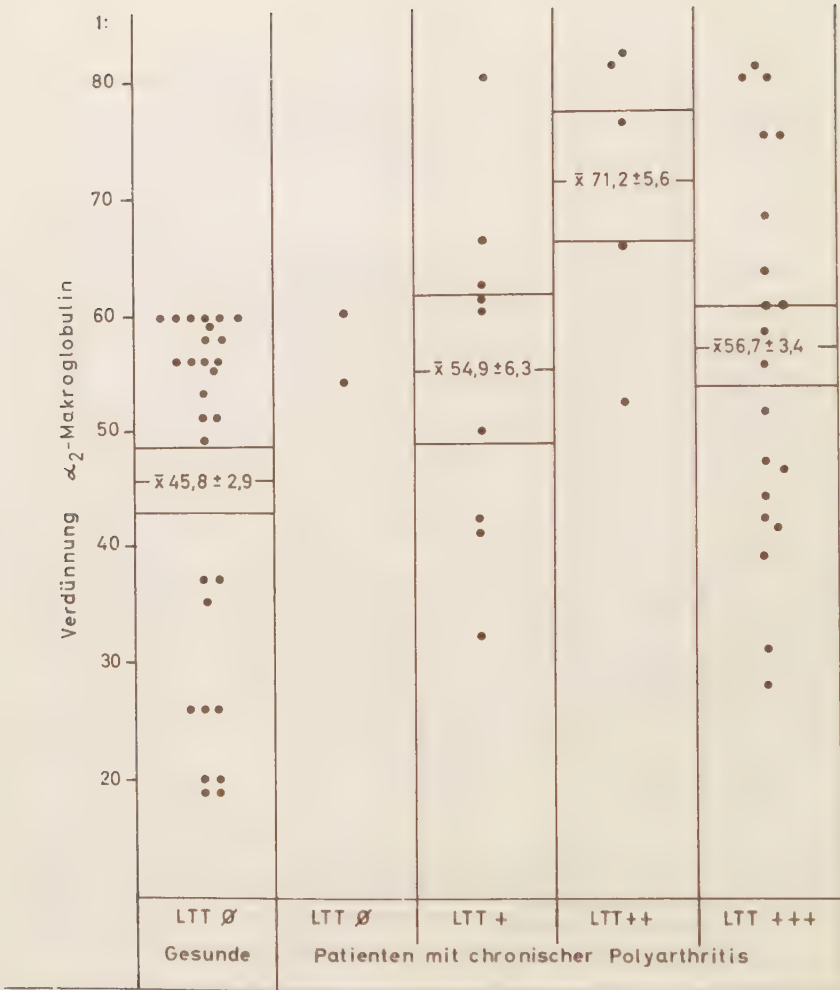


Abbildung 6

Erforderliche Verdünnung der Seren von Gesunden und Polyarthritikern, bei der gegen Anti- α_2 M-Serum keine Präzipitationslinie mehr auftritt, aufgegliedert nach dem Agglutinationsgrad im Latextropfentest (LTT) bei einer Serumverdünnung von 1:20.

heit keine Beziehung zum Rheumafaktor besitzen, zeigen ebenfalls eine höhere Lage der Mittelwerte, wobei der besonders hohe Mittelwert bei 2fach positivem Latextest bei allerdings nur 5 Bestimmungen auffällt. Auch hier fanden sich bei latex-positiven Polyarthritikern zahlreiche Fälle mit normalen Werten. Diese Vergleichsuntersuchung wurde lediglich gezeigt, um zu demonstrieren, daß aus der Vermehrung von Proteinfractionen keinerlei Zusammenhänge mit dem Rheumafaktorgehalt konstruiert werden können.

Versuchsreihe 3

Es sollte in immunelektrophoretischen Untersuchungen versucht werden, den von uns isolierten Rheumafaktor (s.o.) darzustellen, um erste Anhaltspunkte für die Antigendeterminierung der isolierten Substanz zu gewinnen.

Versuchsanordnung

Dieser Versuchsreihe wurde die Methodik 1 zugrundegelegt. Isolierter Rheumafaktor wurde durch Dialyse gegen Aqua dest. weitgehend von den Puffersubstanzen befreit und durch Dialyse gegen Kieselgel etwa 120fach konzentriert. Es wurde mit aus verschiedenen Rheumatikerseren isoliertem Rheumafaktor (RF) gearbeitet. Die auch für spätere Versuchsreihen gültige Bezeichnung der Patientenherkunft von Rheumafaktor, Rheumatikerserum und Anti-Rheumafaktor-Serum wurde vom Namen der Patienten hergeleitet. Die fünf verschiedenen Patienten sind: B (Baumeister, Katharina), H (Huber, Therese), K (Klingel, Hans), P (Perzl, Johann) und R (Raupp, Lilly). Als Antigene wurden vergleichsweise auch Rheumatiker-Vollseren (RS) verschiedener Patienten und als Antikörper Anti-Voll-Humanserum (AHS) und nach oben angegebener Methode gewonnene Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF) verwandt. Die Anti-Rheumafaktor-Seren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit von zwei verschiedenen Patienten stammendem isoliertem Rheumafaktor gewonnen. Anti-Rheumafaktor-Serum 1 (ARF_1) stammt vom Patienten H, Anti-Rheumafaktor-Serum 2 und 3 (ARF_2 , ARF_3) vom Patienten B (durch Immunisierung von zwei verschiedenen Kaninchen gewonnen). Die den einzelnen Versuchen dieser Versuchsreihe zugrundeliegende Anordnung von Antigen und Antikörper ist in den Abbildungen der Präparate angegeben (Abbildung 7).

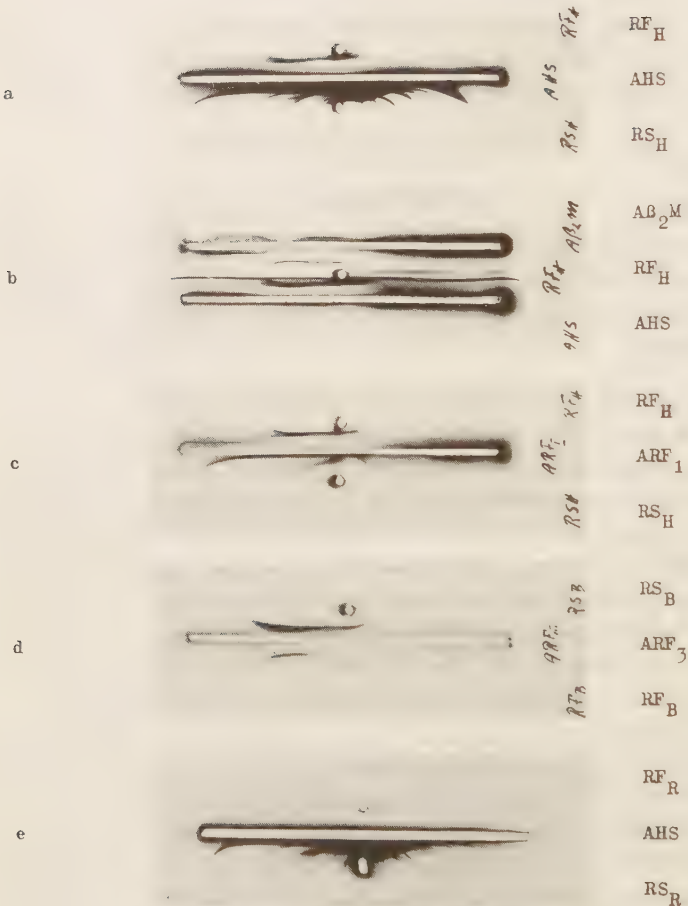


Abbildung 7

Immunelektrophoretische Darstellung der isolierten Rheumafaktoren von 3 Patienten. (RF = Rheumafaktor der Patienten H, R u. B; RS = Rheumatiker-Vollseren der Patienten H, R u. B; AHS = Anti-Human-Vollserum; ARF₁ = Anti-Rheumafaktor-Serum des Patienten H; ARF₃ = Anti-Rheumafaktor-Serum des Patienten B; AB_{2M} = Anti- β_2 -Globulin-Serum)

Besprechung der Ergebnisse

Wir fanden in allen Versuchen eine Linie im β_2 -Makroglobulin-Bereich, allerdings bei den aus verschiedenen Rheumatikerseren isolierten Rheumafaktoren mit geringen Unterschieden. So zeigte der vom Serum des Patienten H stammende Rheumafaktor (RF_{II}) gegen Anti-Vollhuman-Serum eine etwas verwaschene Linie im β_2 -Makroglobulin-Bereich in Höhe des Antigenlagers (Abbildung 7a). Gegen spezifisches Anti- β_{2M} -Globulin-Serum zeigte sich ebenfalls eine deutliche β_{2M} -Globulin-Linie, jedoch hier mit üblicher Lokalisation und Schärfe (Abbildung 7b). Der gleiche Rheumafaktor (RF_{II}) zeigte gegen das gegen ihn selbst gewonnene Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF_1) eine Auftrennung der beschriebenen verwaschenen β_{2M} -Globulin-Linie in zwei deutlich konturierte Präzipitationslinien (Abbildung 7c).

Der vom Patienten B stammende Rheumafaktor (RF_B) ergab gegen das gegen ihn selbst gewonnene Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF_3) eine einzelne Präzipitationslinie im β_{2M} -Globulin-Bereich (Abbildung 7d).

Auch der Rheumafaktor des Patienten R (RF_R) zeigte wie RF_{II} gegen Anti-Vollhuman-Serum eine Präzipitationslinie im β_{2M} -Globulin-Bereich, die verwaschen erschien und in der Höhe des Antigenlagers lokalisiert war (Abbildung 7e).

Da die Immunglobuline immunologisch untereinander keine absolute Spezifität besitzen, kann man die von uns gefundene Linie nicht zwingend den β_2 -Makroglobulinen zuordnen, zumindest wandern sie jedoch immunoelektrophoretisch wie β_2 -Makroglobulin, was die eingangs erwähnten Befunde, daß der Rheumafaktor im β_2 -Makroglobulin-Bereich zu suchen ist, bestätigen würde. Unsere Versuche zeigen, daß die untersuchten Rheumafaktoren gleiche immunologische Eigenschaften aufweisen, daß aber unterschiedliche physikalische Eigenschaften möglich sind, was sich in der verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeit äußert. Möglicherweise handelt es sich beim Rheumafaktor RF_{II} um einen im elektrischen Feld untrennbaren Komplex mit abweichendem Molekulargewicht. Damit wäre zu diskutieren, ob es sich beim Patienten B um ein 19S-Globulin (oder vielleicht auch um einen Intermediärkomplex von 10-15S) und bei den Patienten H und R um einen 22S-Komplex handelt. Über die gefundene γ -Globulin-Linie bei der Untersuchung von RS_B gegen ARF_3 und ARF_1 wird später zu diskutieren sein.

Versuchsreihe 4

Es sollten mit der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony die nach oben angegebener Methodik gewonnenen Anti-Rheumafaktor-Seren hinsichtlich der Determinanz der Antikörper untersucht werden. Gleichzeitig galten diese Untersuchungen als Beweis dafür, daß gegen den isolierten Rheumafaktor Antikörper gebildet wurden und somit die Gewinnung eines Antiserums gegen den mit unserer Methodik isolierten Rheumafaktor gelungen ist.

Versuchsanordnung

Bei diesen Untersuchungen wurde die Methodik 2 angewandt. Es wurde in den Präparaten der Abbildung 8 das Antirheumafaktorserum des Patienten H (ARF_1) gegen unverdünntes, gepooltes Normalserum und gegen unverdünntes Rheumatikerserum des Patienten R (RS_R) untersucht. Dabei war ARF_1 zu verschiedenen Zeiten nach Immunisierungsbeginn (Immunisierungsschema s.o.) abgenommen worden, und zwar 1 Woche (ARF_{1a}), 3 Wochen (ARF_{1b}) und nach vollständiger Immunisierung (ARF_{1c}).

Im Präparat der Abbildung 9 waren gegen unverdünntes Normalserum und gegen das Rheumatikerserum des Patienten B (RS_B) verschiedene, nach Vollimmunisierung gewonnene Anti-Rheumafaktor-Seren aufgetragen worden, einmal das auch in den Präparaten der Abbildung 8 gezeigte ARF_1 , ferner die vom Patienten B stammenden ARF_2 und ARF_3 , die durch Immunisierung zweier Kaninchen gewonnen wurden.

Die in den einzelnen Präparaten gewählte Anordnung geht aus den Abbildungen 8 und 9 hervor.

Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigen, daß die Gewinnung eines Anti-Rheumafaktor-Serums durch Immunisierung von Kaninchen gelungen ist. Sie demonstrieren ferner deutlich die fortschreitende Antikörperbildung, da 1 Woche nach Immunisierungsbeginn noch keine deutlichen Präzipitationslinien sichtbar sind, während nach 2 Wochen bereits Linien auftreten, die nach Vollimmunisierung deutlich sind. Ein Vergleich aller 3 Anti-Rheumafaktor-Seren ergibt den ausgeprägtesten Antikörpergehalt in ARF_1 und ARF_3 , weshalb diese Anti-Rheumafaktor-Seren für alle weiteren Versuche verwandt wurden. Eins der beiden Kaninchen, die mit isoliertem Rheumafaktor des Patienten B immunisiert wurden, zeigte

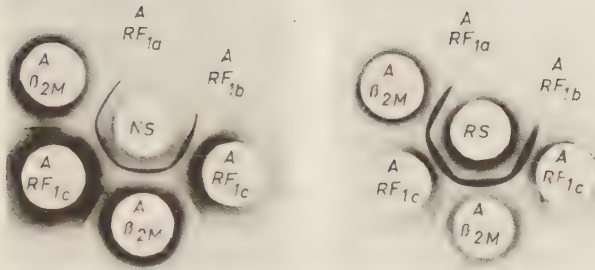


Abbildung 8

Entwicklung der Antikörperbildung bei verschiedener Immunisierungsdauer eines Kaninchens mit Rheumafaktor (RS = Rheumatiker-Serum; NS = Normalserum; AB₂M = Anti-β₂M-Globulin-Serum; ARF = Anti-Rheumafaktor-Serum, a) nach 1 Woche, b) nach 3 Wochen, c) nach vollständiger Immunisierung).

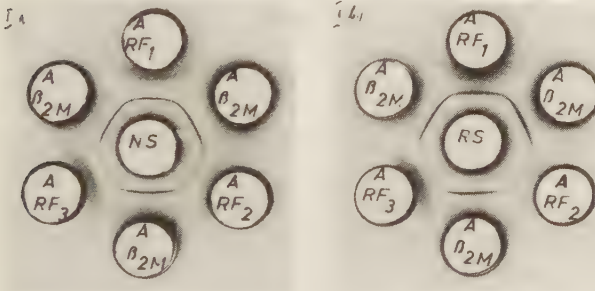


Abbildung 9

Darstellung der Antikörperqualität der gewonnenen Anti-Rheumafaktoren (RS = Rheumatiker-Serum; NS = Normalserum; AB₂M = Anti-β₂M-Globulin-Serum; ARF₁, ARF₂, ARF₃ = verschiedene Anti-Rheumafaktoren-Seren (siehe Text))

also eine schwächere Antikörperbildung.

Die Versuche zeigen die starken Antigeneigenschaften des Rheumafaktors, da die Immunisierung mit unkonzentrierter Rheumafaktoralösung, die nicht direkt faßbare Proteinmengen enthielt, gelang. Auf die Bedeutung der einzelnen Präzipitationslinien ist später einzugehen.

Versuchsreihe 5

Um die Antikörpereigenschaften der Anti-Rheumafaktor-Seren im einzelnen studieren zu können, wurden im Folgenden spezielle Versuchsanordnungen gewählt, die zur Antikörperdeterminierung dienen sollten, und bei denen durch Serumverdünnungen versucht wurde, die vorhandenen Antikörper besser zur Darstellung zu bringen.

Versuchsanordnung

In den Versuchen dieser Reihe wurde unter Verwendung der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony (Methodik 2) gepooltes Normalserum in den Verdünnungen 1:1, 1:5 und 1:10 gegen ARF₁, ARF₃, Anti- β_{2M} -Globulin-Serum (AB_{2M}), Anti-7S- γ -Globulin-Serum (A7S) und Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin-Serum (ACF II) aufgetragen. In der Abbildung 10 ist im einzelnen die Anordnung des Serums und der Antiseren in den Präparaten angegeben.

Besprechung der Ergebnisse

Beide Anti-Rheumafaktor-Seren zeigen in erster Linie einen deutlichen β_{2M} -Globulin-Charakter, der auch schon in den Präparaten der Versuchsreihe 4 zum Ausdruck kam. Bei konzentriertem Normalserum war diese Präzipitationslinie am deutlichsten sichtbar. Daneben zeigte sich eine Linie mit Cohn-Fraktion II- γ -Globulin-Charakter. Im Gegensatz zu dieser Linie war eine Präzipitationslinie gegen Anti-7S- γ -Globulin-Serum nicht deutlich sichtbar. Da die Präzipitationslinie vermutlich durch Antigenüberschuß nicht zustandekam, wurden Serumverdünnungen angewandt. Bei einer Serumverdünnung von 1:5 erschien eine deutliche Präzipitationslinie von 7S- γ -Globulin-Charakter, die Identität mit der Cohn-Fraktion II- γ -Globulin-Linie zeigte, jedoch keine Kreuzreaktion mit β_2 -Makroglobulin aufwies. Damit ist zu sagen, daß wahrscheinlich die isolierten Rheumafaktoren der Patienten II und B Antikörper gegen β_2 -Makroglobulin (19S-Globulin) und

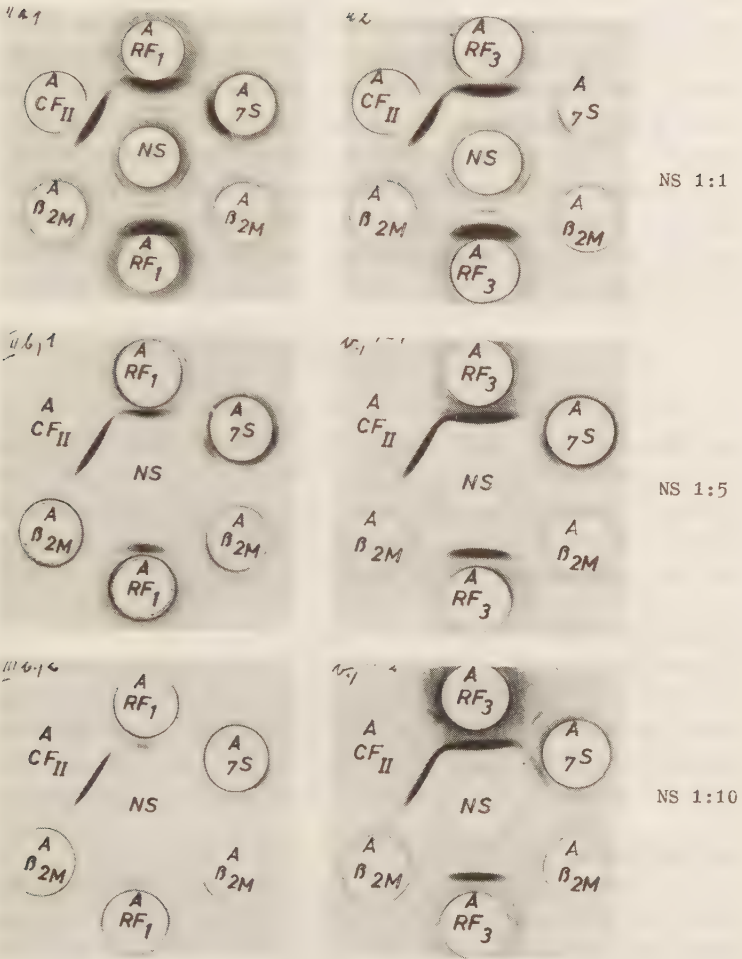


Abbildung 10

Determinierung der Antikörpereigenschaften zweier Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃).

(A7S = Anti-7S-γ-Globulin-Serum; A β_{2M} = Anti- β_{2M} -Globulin-Serum; ACF II = Anti-Cohn-Fraktion II-γ-Globulin-Serum; NS = Normalserum in verschiedenen Verdünnungen)

7S- γ -Globulin im Anti-Rheumafaktor-Serum erzeugten, daß es sich also vielleicht hier um Komplexe aus beiden Bestandteilen handelt. Eine andere Deutungsmöglichkeit wäre, daß beim Isolierungsvorgang geringe Anteile des γ -Globulins, mit dem die Latexpartikel beladen waren, mit abgesprengt wurden und bei der Immunisierung Antikörper erzeugten. Dieses ist aus später zu erörternden Gründen jedoch weniger wahrscheinlich. Schließlich fanden wir eine kaum sichtbare zusätzliche Linie bei der Untersuchung von Normalserum in der Verdünnung 1:1 gegen beide Anti-Rheumafaktor-Seren ohne Determinierungsmöglichkeit.

Versuchsreihe 6

Da sich in den Untersuchungen der Versuchsreihe 5 ergab, daß in den Anti-Rheumafaktor-Seren ein β_2 -Makroglobulin(19S)- und ein 7S- γ -Globulin-Antikörper enthalten waren, sollte mit immunoelektrophoretischen Untersuchungen versucht werden, die Befunde zu reproduzieren und die Eigenschaften der gefundenen Antikörper durch Vergleich mit Anti-Vollhuman-Serum näher zu identifizieren.

Versuchsanordnung

Es wurde die Methodik 1 angewandt. Zur Identitätsbestimmung wurden auf jedem Objektträger zwei Antikörperlager untergebracht. Aufgetragen wurden gepooltes Normalserum bzw. Rheumatikerserum des Patienten B gegen Anti-Vollhuman-Serum und ARF₁ (Anti-Rheumafaktor-Serum von Patient H) und ARF₃ (Anti-Rheumafaktor-Serum von Patient B).

Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, ergaben beide Anti-Rheumafaktor-Seren eine deutliche Linie, die einen Antikörper von Anti- β_2 -Makroglobulin-Charakter aufzeigt, sowie eine Linie, die eine Zugehörigkeit zu Anti- γ -Globulin aufweist. Damit war auch bei dieser Versuchsanordnung wahrscheinlich zu machen, daß die Rheumafaktoren der Patienten H und B Antikörper gegen β_2 -Makroglobulin und γ -Globulin erzeugten, womit die Zusammensetzung aus 19S-Globulin und 7S-Globulin weiterhin zu diskutieren ist.

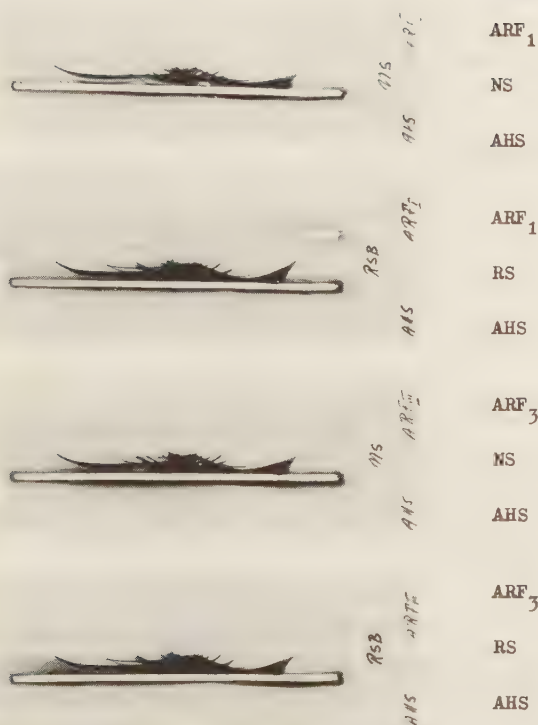


Abbildung 11

Determinierung der bei immunoelektrophoretischer Untersuchung zweier Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃) auftretenden Präzipitationslinien. (NS = Normalserum; RS = Rheumatikerserum; AHS = Anti-Voll-human-Serum)

Versuchsreihe 7

Durch Verdünnung von Rheumatikerserum und Normalserum sollte in dieser Versuchsreihe mit der Immunelektrophorese das Verhalten der gegen Anti-Vollhuman-Serum und gegen Anti-Rheumafaktor-Serum auftretenden Linien näher untersucht werden. Wir glaubten, mit dieser Versuchsanordnung am Beispiel eines Rheumatikerserums die in den Versuchsreihen 1 und 2 getroffene Feststellung der β_{2M} -Globulin-Vermehrung im Rheumatikerserum nochmals bestätigen zu können. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob die bei der Untersuchung der Anti-Rheumafaktor-Seren gefundene γ -Globulin-Linie bei Serumverdünnung besser zum Ausdruck kommt.

Versuchsanordnung

Es wurde die Methode 1 angewandt. Als Antigen wurde gepooltes Normalserum (NS) in den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:5 bzw. Rheumatikerserum des Patienten B (RS_B) in den gleichen Verdünnungen eingefüllt. Antikörper waren Anti-Vollhuman-Serum (AHS) bzw. Anti-Rheumafaktor-Serum des gleichen Patienten B (ARF_3). Die spezielle Anordnung geht aus den Legenden zu den Abbildungen 12 und 13 hervor.

Besprechung der Ergebnisse

In den vergleichenden immunelektrophoretischen Untersuchungen von NS und RS_B gegen ARF_3 (Abbildung 12) war die von ARF_3 gegen NS und RS_B erzeugte Präzipitationslinie im γ -Globulin-Bereich bei einer Antigenverdünnung von 1:5 abgeschwächt. Bei dieser Verdünnung trat jedoch bei Verwendung von RS als Antigen gegen ARF_3 als Antikörper eine zusätzliche, bisher nicht beobachtete Linie auf, die nach Vergleich in einer Untersuchung mit Anti-Vollhuman-Serum statt ARF_3 (Abbildung 13) möglicherweise dem β_{1A} -Globulin zuzuordnen ist. Außerdem bestätigte dieser Versuch, daß bei der Antigen-Serumverdünnung von 1:1 die β_{2M} -Globulin-Linie des RS_B wesentlich stärker ist als die des NS; bei einer Verdünnung von 1:2 ist sie bei RS_B schwächer, aber bei NS nicht mehr erkennbar.

Da demnach die Antigenverdünnungen von 1:1 (deutlichste Ausprägung der β_{2M} -Globulin- und der γ -Globulin-Linie) und 1:5 (Auftreten einer möglichen β_{1A} -Globulin-Linie) das stärkste Interesse beanspruchen, wurden diese Verdünnungen auch in den folgenden Versuchen angewandt.

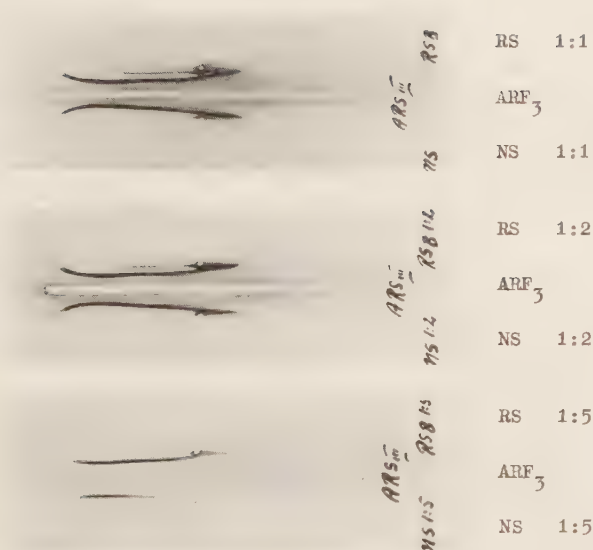


Abbildung 12

Determinierung der bei immunoelektrophoretischer Untersuchung eines Anti-Rheumafaktor-Serums (ARF₃) auftretenden Präzipitationslinien mit Anwendung verschiedener Verdünnungen des Rheumatikerserums (RS) und Normalserums (NS).

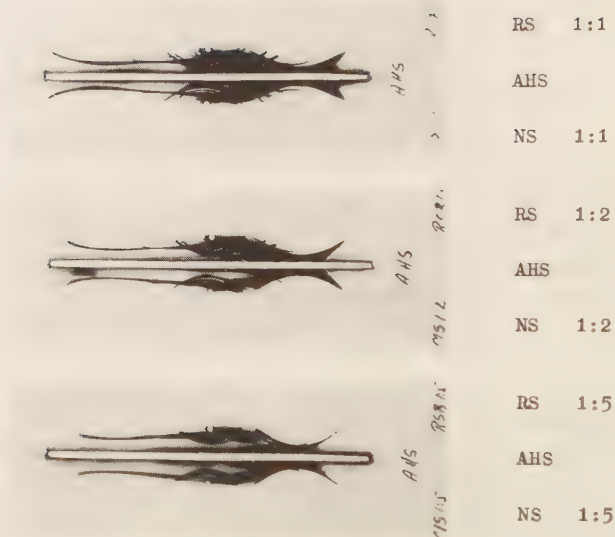


Abbildung 13

Vergleichende Untersuchung zur in Abbildung 12 gegebenen Anordnung mit Anwendung von Anti-Vollhuman-Serum (AHS) statt Anti-Rheumafaktor-Serum.

Versuchsreihe 8

Zur weiteren Klärung der Verhältnisse und vor allem zur Aufdeckung eines etwaigen unterschiedlichen Verhaltens verschiedener Rheumatikerseren und Anti-Rheumafaktor-Seren sollten die Rheumatikerseren der Patienten B, H, K, P und R und vergleichsweise Normalserum (NS) als Antigene gegen die Anti-Rheumafaktor-Seren der Patienten H (ARF₁) und B (ARF₃) als Antikörper in immunoelektrophoretischen Untersuchungen eingefüllt werden.

Versuchsanordnung

Es wurde die Methodik 1 angewandt. Die Rheumatikerseren (RS_B, RS_H, RS_K, RS_P, RS_R) und gepooltes Normalserum (NS) wurde in den Verdünnungen 1:1 und 1:5 angewandt. ARF₁ und ARF₃ wurde unverdünnt eingefüllt. Die jeweilige Versuchsanordnung in den einzelnen Präparaten geht aus den Abbildungen 14-18 hervor.

Besprechung der Ergebnisse

Das auffallendste Ergebnis dieser Versuchsreihe ist eine doppelte γ -Globulin-Linie, die ARF₃ (Anti-Rheumafaktor-Serum von Patient B) bei Einfüllen gegen alle Rheumatikerseren und auch gegen konzentriertes und verdünntes Normalserum (NS) zeigte. ARF₁ (Anti-Rheumafaktor-Serum von Patient H) wies dagegen nur eine γ -Globulin-Linie auf. Eine Interpretation dieses Verhaltens ist schwierig. Es ist zu vermuten, daß im ARF₃ ein Antikörper gegen ein auch in Normalseren vorhandenes 7S- γ -Globulin gebildet wurde, das normalerweise wegen zu geringer Menge und somit zu geringer Antigenwirkung keine Antikörperproduktion hervorruft. Daß das Antigen auch normalerweise vorhanden sein muß, zeigt das Auftreten der Linie auch bei Einfüllen von ARF₃ gegen NS. Da im ARF₃ der zugehörige Antikörper produziert wurde, muß das Antigen im RS_B, aus dem der RF_B isoliert wurde, der zur Gewinnung von ARF₃ führte, in ausreichender Antigenität vorhanden gewesen sein. Ob beim Isolierungsvorgang des RF aus RS_B ein γ -Globulin mit veränderter Molekularstruktur entstanden ist, das den Anlaß zu spezifischer Antikörperbildung gab, ist weniger wahrscheinlich. Als weitere Möglichkeit ist zu diskutieren, daß eine γ -Globulin-Linie einer 7S-Komponente einem 22S-Komplex entspricht, während die zweite γ -Globulin-Linie durch beim Isolierungsvorgang abgesprengtes Reaktant-Material bedingt sein könnte. Auch diese Erklärungsmöglichkeit halten wir für nicht gegeben. Einmal sollte

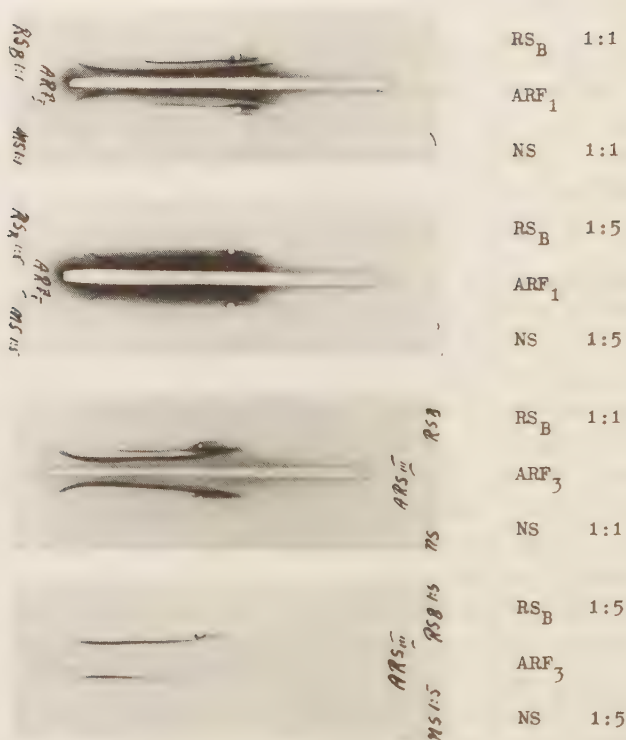


Abbildung 14

Verhalten des Rheumatikerserums des Patienten B (RS_B) und des Normalserums (NS) in der immunoelektrophoretischen Untersuchung mit zwei Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃)

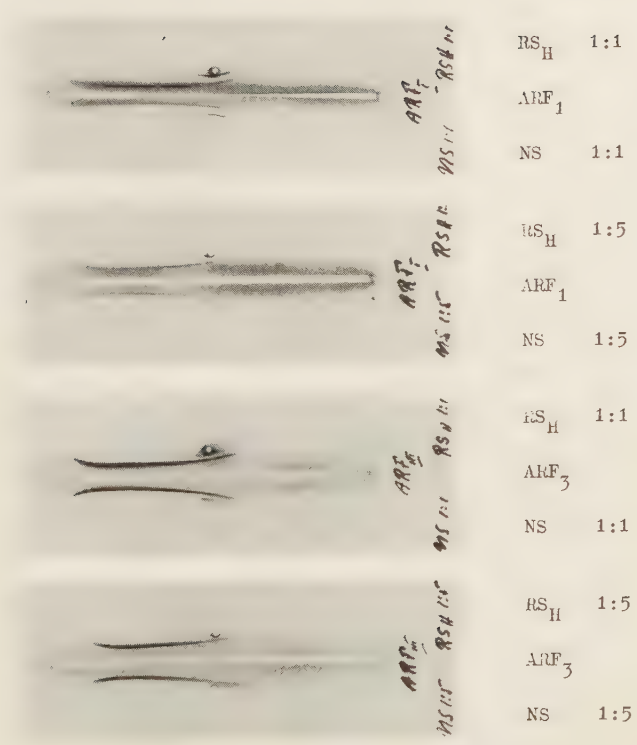


Abbildung 15

Verhalten des Rheumatikerserums des Patienten II (RS_H) und des Normalserums (NS) in der immunoelektrophoretischen Untersuchung mit zwei Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃)

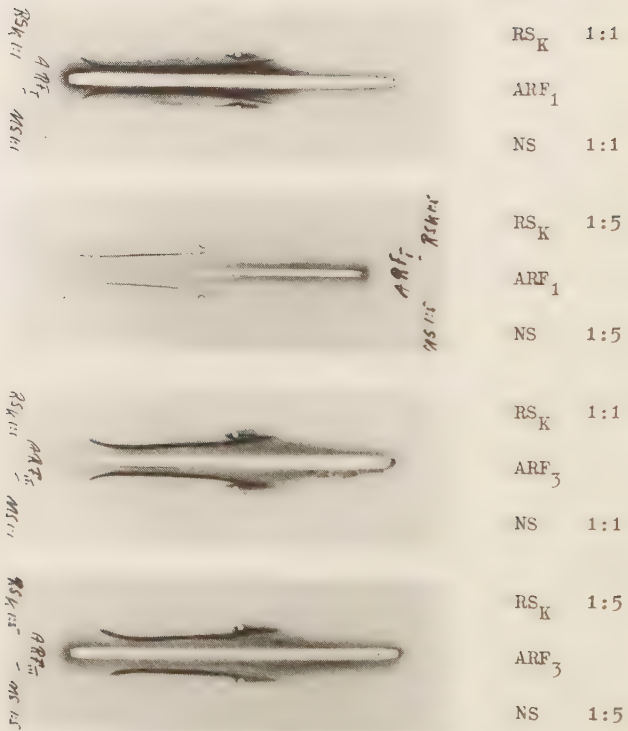


Abbildung 16

Verhalten des Rheumatikerserums des Patienten K (RS_K) und des Normalserums (NS) in der immunoelektrophoretischen Untersuchung mit zwei Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃)

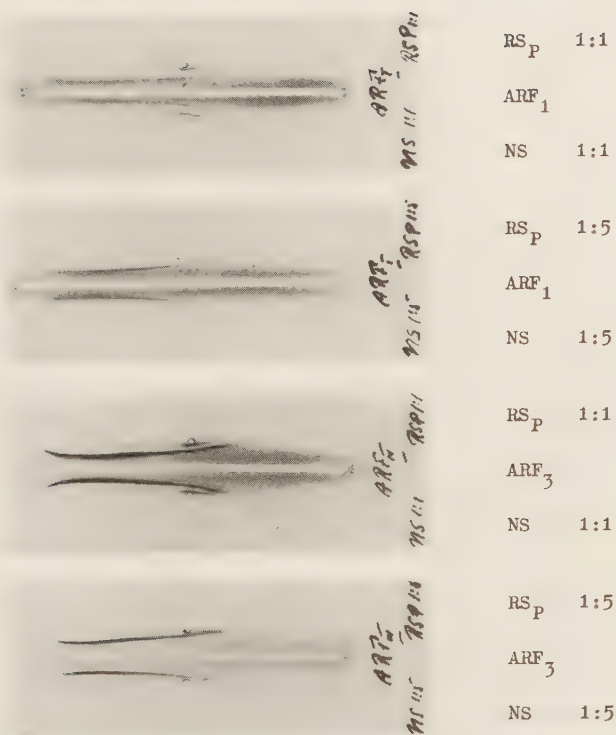


Abbildung 17

Verhalten des Rheumatikerserums des Patienten P (RS_P) und des Normalserums (NS) in der immunoelektrophoretischen Untersuchung mit zwei Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃)

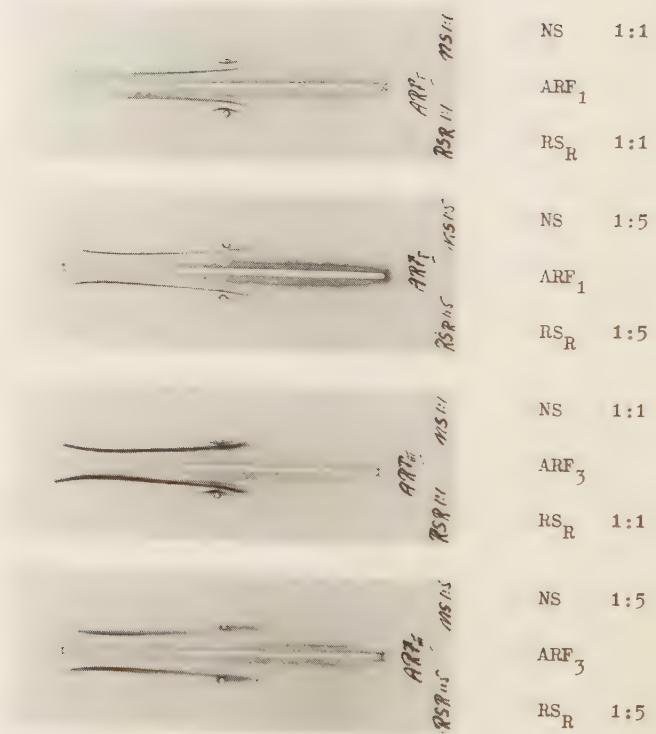


Abbildung 18

Verhalten des Rheumatikerserums des Patienten R (RS_R) und des Normalserums (NS) in der immunoelektrophoretischen Untersuchung mit zwei Anti-Rheumafaktor-Seren (ARF₁ und ARF₃)

man annehmen, daß bei gleichzeitiger Absprennung von Reaktant-Material zumindest nach Wiederabkühlung der Rheumafaktor erneut eine Reaktion mit dem Reaktant eingeht. Das kann jedoch nicht der Fall sein, da der abgesprengte Rheumafaktor weiterhin im Agglutinationstest reaktionsfähig bleibt. Zum anderen wäre bei Mitabsprennung von Cohn-Fraktion II anzunehmen, daß außer 7S- γ -Globulin auch andere Proteine erscheinen und zur Antikörperbildung führen müßten. Nach B e r n h a r d und Mitarbeitern⁹ binden die Latexpartikel nicht nur 7S- γ -Globulin sondern gleichzeitig alle angebotenen Proteine, während jedoch nur die aggregierten 7S- γ -Globuline mit Rheumafaktor reagieren. Cohn-Fraktion II enthält jedoch außer 7S- γ -Globulin noch mehrere Proteine⁴⁴, gegen die in unseren Anti-Rheumafaktor-Seren keine Antikörper auftraten. Zudem wäre unwahrscheinlich, warum nur die eine der beiden Lösungen mit isoliertem Rheumafaktor abgesprengtes 7S- γ -Globulin enthalten sollte. Wir haben jedoch Anhaltspunkte dafür, daß es sich beim Rheumafaktor des Patienten B um einen Intermediärkomplex bzw. um einen 7S- γ -Globulin-Rheumafaktor handelt, bei dem 19S- und 7S-Globuline serologisch aktiv sein können⁶⁷. Diese Deutung würde das Auftreten von Antikörpern gegen β_2 -Makroglobulin (19S) und ein zusätzliches γ -Globulin bei Immunisierung von Kaninchen mit einem derartigen Rheumafaktor erklären. Die andere Linie im γ -Globulin-Bereich entspräche dann der Präzipitationslinie, die - wie auch bei den anderen Präparaten - durch Antikörper gegen eventuell angelagertes 7S-Globulin, das serologisch inaktiv ist, bedingt sein könnte. Leider fehlte uns die Möglichkeit, durch Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge dieser Annahme näher nachzugehen. Da Intermediärkomplexe vorwiegend in hochtitrigen Rheumatikerseren auftreten^{70, 67}, ist im Falle dieses Patienten B das Vorhandensein eines Intermediärkomplexes durchaus möglich, da wir hier im Latexfixationstest (siehe unsere Untersuchungen über die Reaktionsweise der Inhibitoren) eine Titerhöhe von 1:2560 feststellten.

Als weiterer Fall eines hochtitrigen Rheumatikerserums mit möglichem Intermediärkomplex bzw. serologisch aktivem 7S-Globulin präsentiert sich uns das Serum des Patienten K. Ein Anti-Rheumafaktor-Serum dieses Patienten lag uns leider nicht vor, weshalb eine vergleichende Betrachtung mit den beim Patienten B gefundenen Verhältnissen nicht möglich war. Es fiel uns beim Patienten K jedoch auf, daß sein Serum gegen ARF₁ und ARF₃ nur eine sehr schwache Linie im β_2 -Makroglobulin-

Bereich erkennen ließ (Abbildung 16). Da der Rheumafaktor dieses Patienten (RF_K), wie später zu zeigen sein wird, keinen β_{2M} -Globulin-Charakter aufweist, könnte dieser Befund bedeuten, daß bei ihm kein 19S-Globulin serologisch aktiv war. Es könnte sich also lediglich um ein serologisch aktives 7S-Globulin ohne gleichzeitige 19S-Aktivität handeln.

Schließlich fanden wir auch in diesen Versuchen die bereits in Versuchsreihe 7 erwähnte Präzipitationslinie im mutmaßlichen β_{1A} -Globulin-Bereich. Die Linie trat bei allen fünf als Antigen geprüften Rheumatikerseren in der Verdünnung von 1:5 auf, davon in einem Fall (Patient H) allerdings nur gegen ARF_3 (Abbildung 15), und in einem weiteren Fall (Patient P) gegen ARF_1 nur sehr schwach (Abbildung 17). Die Bedeutung dieser Linie ist später zu diskutieren.

Versuchsreihe 9

Es sollte in Doppelschlitz-Präparaten als Antigen RS_B und als Antikörper einerseits ARF_1 und ARF_3 und andererseits Anti-Transferrin, Anti- β_{2M} -Globulin, Anti- β_{2A} -Globulin, Anti-7S- γ -Globulin und Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin eingefüllt werden, um eine nähere Determinierung der durch ARF erzeugten Linien zu ermöglichen.

Versuchsordnung

Den Versuchen lag die Methodik 1 zugrunde. Die genaue Versuchsordnung ist aus den Abbildungen 19-22 ersichtlich.

Besprechung der Ergebnisse

Beide Anti-Rheumafaktor-Seren ergaben gegen Rheumatikerserum (RS_B) (konzentriert und 1:5 verdünnt) eine Präzipitationslinie, die Identität mit der durch spezifisches Anti- β_{2M} -Globulin-Serum erzeugten Linie zeigte. Der Gehalt der Anti-Rheumafaktor-Seren an Anti- β_2 -Makroglobulin erscheint damit gesichert.

Das Anti-Rheumafaktor-Serum des Patienten H (ARF_1) zeigte gegen RS_B eine Präzipitationslinie im γ -Globulin-Bereich, die sowohl mit der durch spezifisches Anti-7S- γ -Globulin als auch mit der durch Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin erzeugten Linie Identität erkennen ließ. Dagegen ergab das Anti-Rheumafaktor-Serum des Patienten B (ARF_3) gegen RS_B eindeutig zwei Präzipitationslinien im γ -Globulin-Bereich,

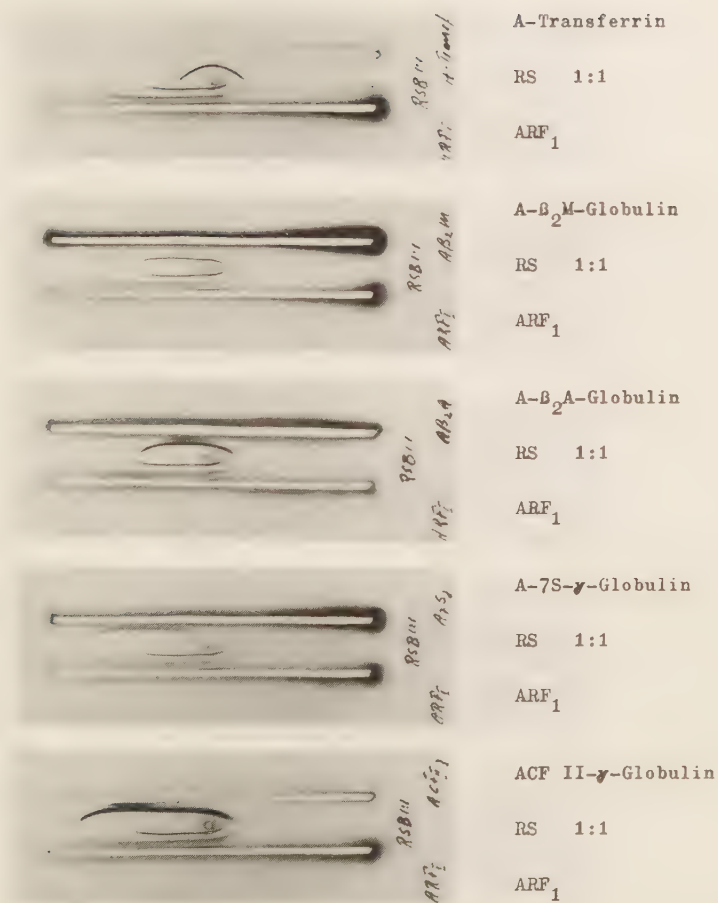


Abbildung 19

Versuche zur Determinierung der durch Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF₁) dargestellten Präzipitationslinien durch Anwendung spezifischer Antiseren (s.o.) und unverdünntem Rheumatikerserum (RS)

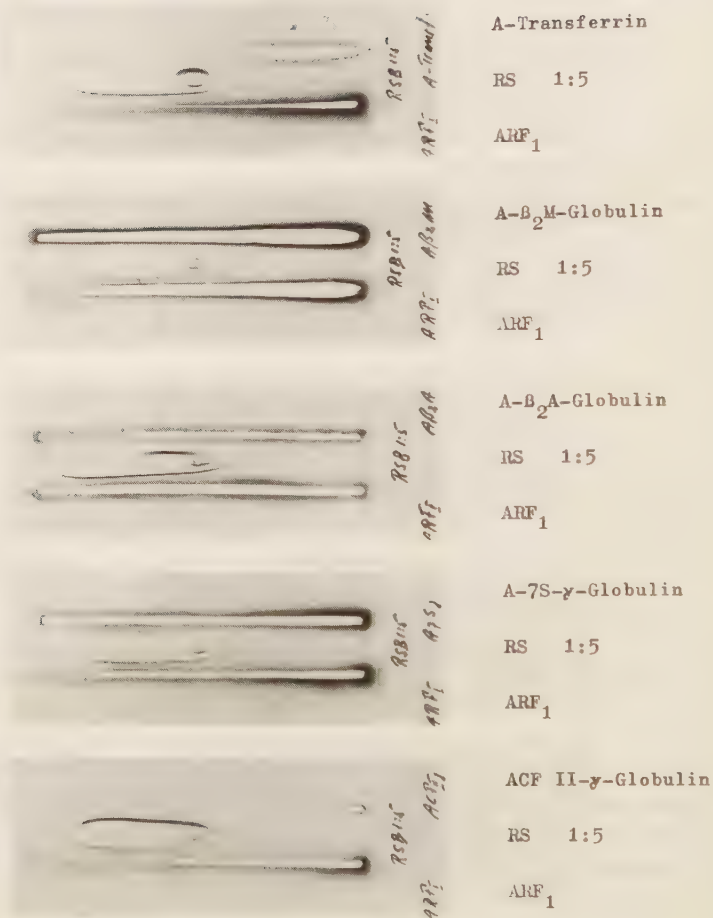


Abbildung 20

Versuche zur Determinierung der durch Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF₁) dargestellten Präzipitationslinien durch Anwendung spezifischer Antiseren (s.o.) und Rheumatiker-Serum (RS) in Verdünnung 1:5

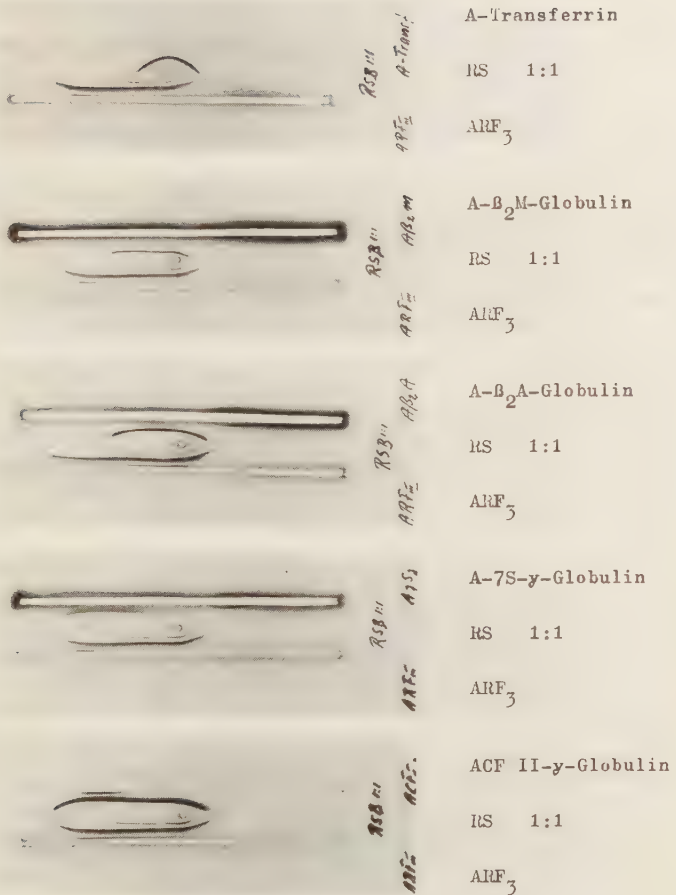


Abbildung 21

Versuche zur Determinierung der durch Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF₃) dargestellten Präzipitationslinien durch Anwendung spezifischer Antiseren (s.o.) und unverdünntem Rheumatikerserum (RS)

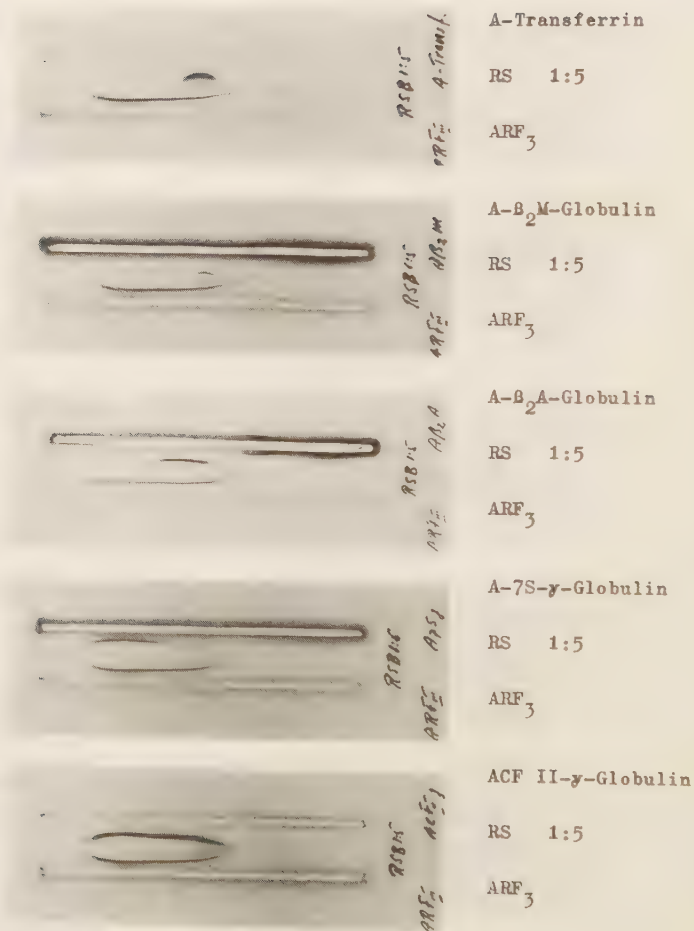


Abbildung 22

Versuche zur Determinierung der durch Anti-Rheumafaktor-Serum (ARF₃) dargestellten Präzipitationslinien durch Anwendung spezifischer Antiseren (s.o.) und Rheumatikerserum in Verdünnung 1:5

von denen die eine eher mit der durch Anti-7S- γ -Globulin erzeugten Linie und die andere mehr mit der durch Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin hervorgerufenen Präzipitationslinie identisch zu sein scheint. Dieser Befund bestätigt den in der vorigen Versuchsreihe getroffenen und bereits diskutierten Befund zweier Anti- γ -Globulin-Charakteristika im ARF₃.

Im Präzipitationsbogen des Transferrins (Auf Abbildung 20 mit Antigenverdünnung von 1:5 am besten erkennbar) erscheint die durch Anti-Rheumafaktor-Serum erzeugte Präzipitationslinie, deren β_{1A} -Globulin-Identität wir diskutiert haben. Diese Linie ist nicht mit Transferrin identisch, desgleichen nicht mit β_{2M} -Globulin und γ -Globulin, ihre Lage im Präzipitationsbogen des Transferrins deutet jedoch auf die tatsächliche Identität der fraglichen Linie mit β_{1A} -Globulin hin. Da ein spezifisches Anti- β_{1A-C} -Globulin-Serum nicht erhältlich ist, ist eine beweisende Determination nicht möglich. Dennoch erscheint uns durch die beschriebenen Versuche annähernd gesichert, daß im Anti-Rheumafaktor-Serum ein Anti- β_{1A} -Globulin enthalten ist.

Die durch ein spezifisches Anti- β_{2A} -Globulin-Serum gegen RS auftretende Präzipitationslinie zeigte keine Identität mit einer der durch Anti-Rheumafaktor-Serum auftretenden Linien.

Versuchsreihe 10

Es wurden eingehendere Untersuchungen über den Antigencharakter der isolierten Rheumafaktoren der verschiedenen Patienten mit der Doppeldiffusionsmethode nach Cuchterlony durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten vor allem der Identitätsbestimmung der in den immunoelektrophoretischen Präparaten aufgefundenen Präzipitationslinien dienen.

Versuchsanordnung

Die Untersuchungen wurden nach der Methodik 2 vorgenommen. Die Anordnung der Rheumafaktoren bzw. der verschiedenen Antigene in den einzelnen Präparaten ist aus den Abbildungen 23-27 zu entnehmen. Verwendet wurden Rheumafaktor RF_K, RF_H, RF_P, RF_B und RF_R sowie als Antiseren ARF₁, ARF₃, Anti-7S- γ -Globulin (A7S), Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin (ACF II) und Anti- β_{2M} -Globulin (AB_{2M}).

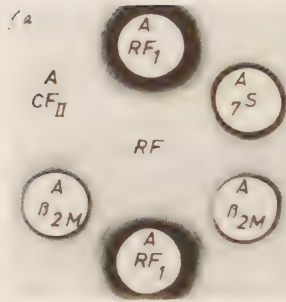


Abbildung 23

Untersuchung im Uchterlony zur Determinierung der durch isolierten Rheumafaktor (RF) des Patienten K hervorgerufenen Präzipitationslinien.

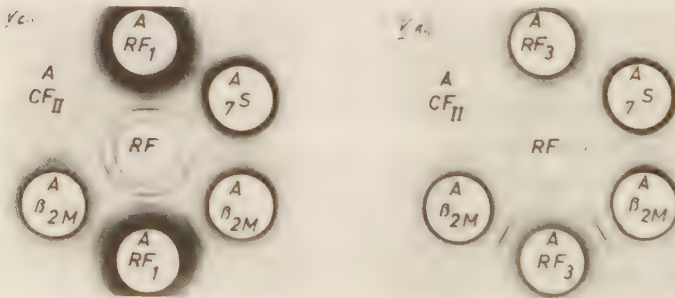


Abbildung 24

Untersuchungen im Uchterlony zur Determinierung der durch isolierten Rheumafaktor (RF) des Patienten H hervorgerufenen Präzipitationslinien.

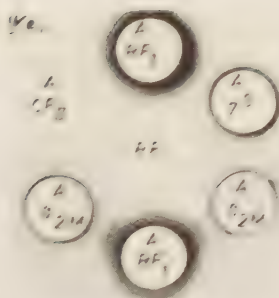


Abbildung 25

Untersuchung im Zentrifugenzug zur Determinierung der durch isolierten Rheumafaktor (RF) des Patienten r hervorgerufenen Präzipitationen.

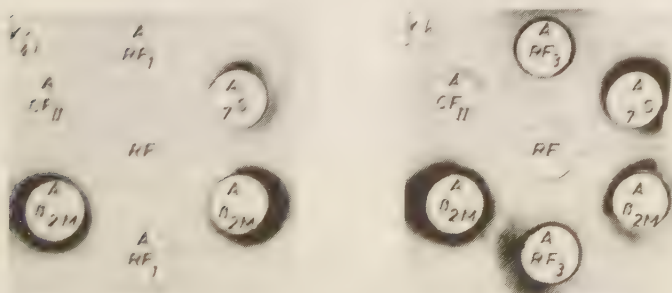


Abbildung 26

Untersuchung im Zentrifugenzug zur Determinierung der durch isolierten Rheumafaktor (RF) des Patienten B hervorgerufenen Präzipitationen.

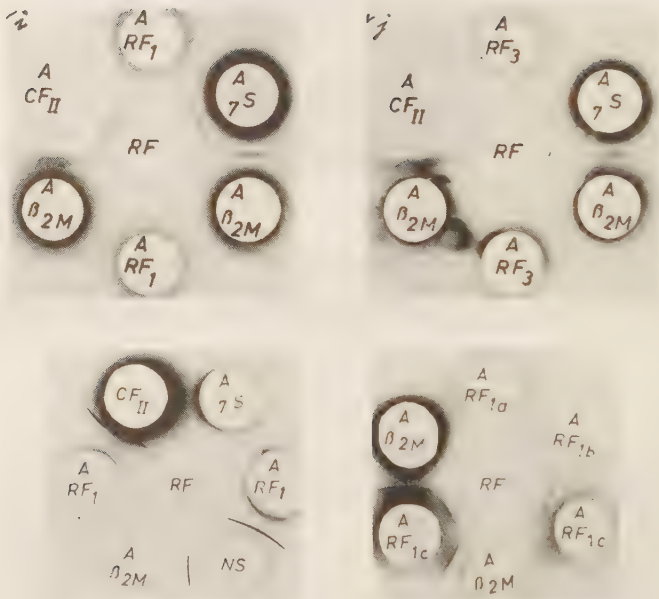


Abbildung 27

Untersuchungen im Ouchterlony zur Determinierung der durch isolierten Rheumafaktor (RF) des Patienten R hervorgerufenen Präzipitationslinien.

Besprechung der Ergebnisse

Die bei Verwendung der RF verschiedener Patienten als Antigen gefundenen Präzipitationslinien sind nicht einheitlich. RF_K (Abbildung 23) zeigte auffallenderweise keine Linie mit β_2 -Makroglobulin-Identität. Damit wird unsere in Versuchsreihe 8 geäußerte Ansicht, daß es sich bei diesem Patienten K um ein serologisch aktives 7S-Globulin ohne aktives 19S-Globulin handelt, weiter gestützt. Man hätte sonst bei Verwendung des isolierten Rheumafaktors auf jeden Fall eine Linie mit β_{2M} -Globulin-Charakter erwarten sollen, die bei den anderen Patienten so überaus deutlich war. Wir fanden jedoch eine Präzipitationslinie gegen ARF₁, A7S und ACF II, die gegen alle diese Antiseren Identität zeigte. Es ist anzunehmen, daß es sich hier um das bei der Rheumafaktor-Isolierung gewonnene aktive 7S-Molekül handelt, das demnach auch gegen ACF II Antigenidentität aufweist.

Bei der Untersuchung von RF_H (Abbildung 24) sahen wir je 2 Linien gegen ARF₁ und ARF₃, eine isolierte Linie gegen AB_{2M} und eine etwas verwaschene Linie gegen A7S und ACF II mit unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten. Die Linien gegen A7S und ACF II zeigten sowohl untereinander als auch gegen AB_{2M} eine Kreuzreaktion, sind also teilidentisch. Die Untersuchungen mit RF_H in Versuchsreihe 3 hatten vermuten lassen, daß es sich bei diesem Patienten H um einen 22S-Komplex handelt, da in der Immunelektrophorese die Präzipitationslinie mit der Lokalisation von β_2 -Makroglobulin eine langsamere Diffusionsgeschwindigkeit zeigte und damit ein größeres Molekül vermuten ließ. Da das Anti-Rheumafaktor-Serum dieses Patienten nach den Ergebnissen der Versuchsreihe 5 und 6 einen Antikörpercharakter von AB_{2M} und A7S (bzw. Anti- γ -Globulin) zeigte, kann angenommen werden, daß der Rheumafaktor des Patienten H Antikörper gegen beide Komponenten des 22S-Komplexes (19S und 7S) bildete. Die Kreuzreaktion, die der isolierte RF_H zwischen A7S und AB_{2M} erkennen ließ, läßt vermuten, daß der Komplex als Ganzes diese Teilidentität mit seinen Komponenten verursacht. Damit bleibt allerdings noch unklar, warum A7S und ACF II ebenfalls nur eine Teilidentität zeigen. Vielleicht spielt hier der Aggregationszustand der γ -Globulinmoleküle in der Cohn-Fraktion II eine Rolle, die nur eine Teilidentität der Antikörper bedingen.

RF_P (Abbildung 25) zeigte gegen ARF₁, A7S, ACF II und AB_{2M} (letztere in der Reproduktion des Präparates weniger sichtbar) eine offensichtlich identische Linie. Der Rheumafaktor des Patienten P zeigte also 19S- und 7S-Antigenität, wobei anscheinend beide als Komplex Antigenwirkung besitzen. Vermutlich liegt der Komplex also als Einheit und nicht in dissoziierter Form vor.

RF_B (Abbildung 26) ergab gegen ARF₁ und ARF₃ zwei Präzipitationslinien, wovon die eine Identität mit Anti-B_{2M}-Globulin, die andere mit Anti-Cohn-Fraktion II- γ -Globulin und Anti-7S- γ -Globulin zeigte. Im Zusammenhang mit unseren oben angeführten Befunden ist weiterhin zu diskutieren, ob es sich beim Rheumafaktor des Patienten B um einen Rheumafaktor mit einem 22S-Komplex aus aktivem 19S-Globulin mit angelagertem 7S- γ -Globulin oder vielleicht auch um einen Intermediärkomplex (aktives 7S-Globulin) bei gleichzeitiger 19S-Aktivität handelt.

RF_R (Abbildung 27) ließ gegen ARF₁ und ARF₃ drei verschiedene Präzipitationslinien erkennen, wovon eine Identität mit AB_{2M}, die zweite mit A7S und die dritte mit ACF II zeigte. Damit dürfte der RF dieses Patienten R eine 19S-Aktivität aufweisen. Die gegen A7S identische Linie entspricht wahrscheinlich einem aktiven Globulin und die gegen ACF II identische Linie inaktivem γ -Globulin-Material als Komponente einer Komplex-Bildung.

Untersuchungen über die Reaktionsweise der Inhibitoren

Aufgabe dieser Untersuchungsreihen war, durch besondere Versuchsanordnungen Anhaltspunkte für die Reaktionsweise der die latexagglutinierende Wirkung des Rheumafaktors inhibierenden Faktoren zu gewinnen. Es wurde dabei von den bisherigen Erkenntnissen der Existenz hitzelabiler und hitzestabiler Inhibitoren ausgegangen.

Untersuchungsmaterialien, Reagentien und apparative Ausrüstung

- a) Rheumafaktor-positives, hochtitriges Rheumatikerserum.
- b) Rheumafaktor-negative Seren gesunder Versuchspersonen (Normalseren).
Bei den zu vergleichenden Untersuchungen einer Versuchsreihe wurde stets das gleiche Normalserum verwandt.
- c) Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latexpartikel (handelsübliches Reagens der Behring-Werke, Marburg).
- d) Glykokoll-NaCl-Pufferlösung pH 8,2 (handelsübliches Reagens der Behring-Werke, Marburg).
- e) Eppendorf-Photometer, Filter mit einer Wellenlänge von 578 nm, Schichtdicke 10 mm.

Methodik

Es wurde den Untersuchungen eine nach B e r n h a r d ⁹ modifizierte Methode eines Latex-Fixationstestes zugrundegelegt, die nach entsprechenden Vorversuchen eine genaue Erfassung des durch die Bindung von Reaktor an Reaktant induzierten Agglutinationsgrades der Latexpartikel gestattete. Das Prinzip dieses Latexagglutinationstestes beruht auf der Messung der optischen Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel.

Der Untersuchungsgang gestaltete sich im einzelnen folgendermaßen: Es wurde mit Puffer (d) eine geometrische Verdünnungsreihe des Rheumatikerserums (a) von 1:20 bis 1:40960 hergestellt, wobei jedes Röhrchen insgesamt 2 ml Material enthielt. Außerdem wurden in jeder Untersuchungsreihe zunächst drei Kontrollröhrchen mit Pufferlösung (d) mitgeführt. Zu jedem Röhrchen wurden, abgesehen von einem der Kontrollröhrchen, je 2 ml einer mit Pufferlösung (d) auf 1:50 verdünnten Latexsuspension (c) gegeben. Nach guter Durchmischung erfolgte Inkubation bei je nach Fragestellung der Versuche unterschiedlichen

Temperaturen und Zeiten, im allgemeinen 60 min bei 56°C. Die Röhrchen wurden anschließend bis auf das Kontrollröhrchen mit reiner Pufferlösung und eines der restlichen zwei Kontrollröhrchen mit Pufferlösung mit Latexsuspension 5 min bei 2400 U/min zentrifugiert. Dann wurde der Bodensatz durch vorsichtiges Umschütteln resuspendiert und nochmals 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand eines jeden Röhrchens sowie der Inhalt der beiden nicht zentrifugierten Kontrollröhrchen wurde dann einer photometrischen Trübungsmessung mit dem Eppendorf-Photometer mit Filter 578 nm (e) unterzogen. Die optische Dichte des Überstandes ist das Maß für die nicht agglutinierten Latexpartikel, die sich im Zentrifugationsrückstand befinden. Das Kontrollröhrchen mit reiner Pufferlösung gibt den Wert für 0%, da sich keine suspendierten Latexpartikel im Überstand befinden. Das nicht zentrifugierte Röhrchen, dessen Inhalt vor der photometrischen Messung nochmals aufgeschüttelt wurde, galt als Maß für eine vollständig im Überstand befindliche Konzentration der Latexpartikel. Dagegen gibt das mitzentrifugierte Kontrollröhrchen die restliche optische Dichte an, die der Überstand durch Spontanagglutination eines Teils der Latexpartikel aufweist. Die optische Dichte unter Berücksichtigung der Spontanagglutination beläuft sich nach Vorversuchen auf 88-75% der optischen Dichte bei voll suspendierten Latexpartikeln, gleichbedeutend mit einer Spontanagglutination von 12-25% der Latexpartikel. Um diesen von Untersuchungsgang zu Untersuchungsgang zwangsläufig variierenden Fehler auszuschalten, wurde nach den Vorversuchen zunächst die optische Dichte nach Zentrifugation, also nach Abzug der spontan agglutinierten Latexpartikel als 100%-Wert der optischen Dichte betrachtet. Dabei ist zu bemerken, daß alle Röhrchen einer Untersuchung mit den gleichen Seren und mit den Reagentien einer Charge bearbeitet und vor allem in einem Arbeitsgang zentrifugiert wurden.

Im weiteren Verlauf der Voruntersuchungen stellte es sich, um exakt vergleichbare Werte mit Ergebnissen anderer Untersuchungsreihen zu erzielen, als zweckmäßig heraus, mögliche leichte Serumtrübungen bei der Bewertung auszuschalten. Dies geschah dadurch, daß bei der Berechnung der prozentualen optischen Dichte schließlich der 100%-Wert nicht mit Latex-Puffersuspension, sondern mit den jeweiligen Seren festgelegt wurde. Hierzu war es notwendig, eine Serumverdünnung

heranzuziehen, die keinen Einfluß auf die Agglutination der Latexpartikel mehr ausübt. Es war also eine Verdünnung zu wählen, die oberhalb der Verdünnung liegt, die die optische Dichte des Überstandes gegenüber niedrigeren Verdünnungen nicht mehr verändert. Das war bei den verwendeten Seren oberhalb der Referenzserumverdünnung von 1:5120 der Fall, weshalb die geometrische Verdünnungsreihe bis auf 1:40960 verlängert und der Mittelwert der optischen Dichte der letzten drei Verdünnungen als 100%-Wert (Kontrollwert = K) festgelegt wurde. Auf diesen Festpunkt wurden in den Hauptversuchen die erhaltenen Meßwerte der optischen Dichte des Überstandes bei verschiedenen Verdünnungen des Rheumatikerserums bezogen und als % der optischen Dichte berechnet und in ein Koordinatensystem eingetragen. Die Abschätzung des relativen Fehlers ergab nach statistischer Berechnung eine Fehlerbreite von -7% bis +5%.

Bei den weiteren Untersuchungen über die Beeinflussung der Latexagglutination des Rheumatikerserums (Referenzserum) durch in Normalseren befindliche Inhibitoren vermehrte sich die Zahl der Reaktionsteilnehmer um eine Verdünnung von Normalserum (b). Dieses wurde in je nach Versuchsreihe unterschiedlichen mit Pufferlösung (d) vorgenommenen Verdünnungen (1:5 bzs. 1:10) in einer Flüssigkeitsmenge von 2 ml jedem Röhrchen der Rheumatikerserumverdünnungen zugefügt. Dabei war in jedem Versuch die Normalserumverdünnung, die den einzelnen Rheumatikerserumverdünnungen zugesetzt wurde, die gleiche. In den Versuchen, in denen keine Zugabe von Normalserum erfolgte, wurde die gleiche Menge von 2 ml durch reine Pufferlösung (d) ersetzt. Die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Reaktionsteilnehmer sowie Inkubationsdauer und -temperatur variierte dabei je nach Fragestellung. Auch wurde teils mit nativen, teils mit inaktivierten Normalseren gearbeitet. Das Referenzserum wurde nicht inaktiviert. Die jeweilige spezielle Versuchsanordnung ist unter den einzelnen Versuchsreihen angegeben. Sie wurde neben einer textlichen Erläuterung der Übersichtlichkeit halber in Form von Formeln dargestellt. Es bedeuten hierbei: R = Rheumatikerserum, N = Normalserum, L = Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latexpartikel. Bei Angabe zweier Inkubations- bzw. Inaktivierungstemperaturen und -zeiten wurde der untere Vorgang im Anschluß an den oberen durchgeführt.

Versuchsreihe 1

Es war zunächst die Brauchbarkeit der Methode als Latexfixationstest zu zeigen. Dazu war unter Anwendung oben genannter Methodik die optische Dichte des Überstandes bei verschiedenen Verdünnungen von Rheumatiker Serum im Vergleich zu einem Normalserum zu bestimmen. Im Falle des Rheumatiker Serums, das in allen Versuchen dieser Reihe das gleiche und im Latex-Tropfentest bis zu einer Verdünnung von 1:320 positiv war, wurden ferner verschiedene Inkubationstemperaturen (37°C und 56°C) sowie unterschiedliche Inkubationszeiten angewandt, um eine möglichst vollständige Bindung des Rheumafaktors an die beladenen Latexpartikel zu erreichen und zu dokumentieren. Prinzipiell wurden Nativ-Seren verwendet und die jeweilige Rheumatiker Serum- bzw. Normalserumverdünnung der konstanten Menge Latexsuspension zugegeben und anschließend je nach Versuch verschieden lang bei unterschiedlicher Temperatur inkubiert. Im Anschluß an die oben eingehend geschilderten Zentrifugationsvorgänge wurde dann von jedem Röhrchen die optische Dichte des Überstandes gemessen und in Prozent des Kontrollwertes umgerechnet.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) 30' 37°

Versuch b: (R + L) 45' 37°

Versuch c: (R + L) 60' 37°

Versuch d: (R + L) 30' 56°

Versuch e: (R + L) 60' 56°

Versuch f: (N + L) 45' 37°

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse, die in Abbildung 28 dargestellt sind, zeigen, daß die Methodik zur Erfassung der Rheumafaktor-Aktivität brauchbar und sehr empfindlich ist. Die Werte der Versuche a bis e (Rheumatiker Serum) zeigen in den Verdünnungen 1:80 und 1:160 eine maximale Abnahme der optischen Dichte des Überstandes, was einer Zunahme agglu-

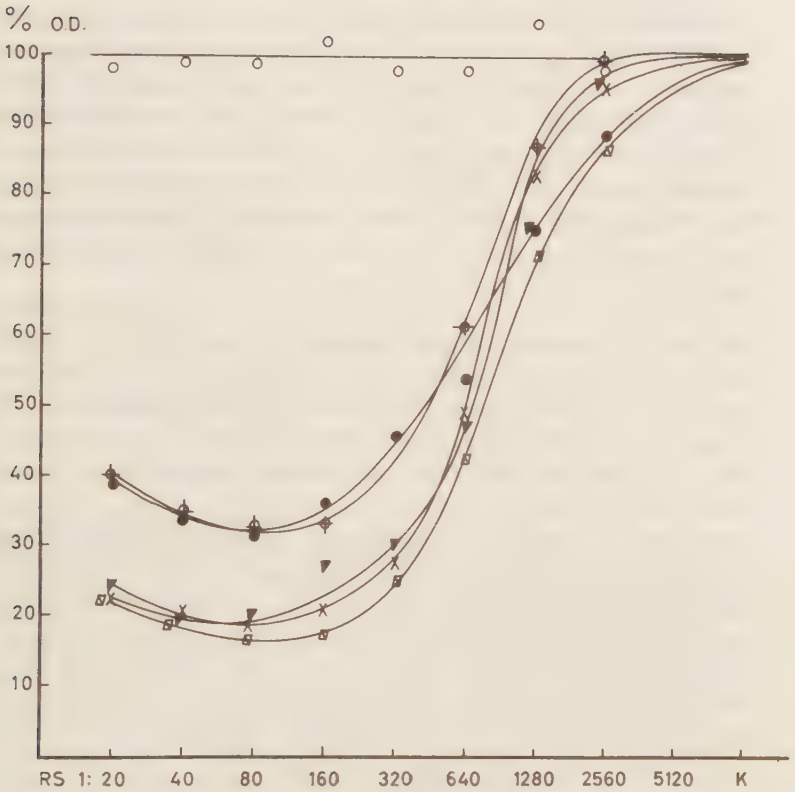


Abbildung 28

- = Versuch 1a
- × = Versuch 1b
- ▼ = Versuch 1c
- ◆ = Versuch 1d
- ◻ = Versuch 1e
- = Versuch 1f

Agglutinationskurven (optische Dichte im Überstand nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel) durch Rheumatiker Serum in verschiedenen Verdünnungen bei Zugabe zu konstanter Menge einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln. Anwendung verschiedener Inkubationsdauer und -zeiten. Als Kontrollkurve (1f) Normalserum statt Rheumatiker Serum. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 1 angegebenen Versuchsanordnungen.

tinierter Latexpartikel entspricht. In den Verdünnungen 1:20 und 1:40 kommt ein leichtes Prozonenphänomen zum Ausdruck. Beginnend mit der Verdünnung 1:320 nimmt die optische Dichte des Überstandes dann deutlich zu, um etwa bei 1:5120 die Größenordnung der Kontrollwerte zu erreichen, womit ausgesagt wird, daß in diesen Verdünnungen keine Bindung an die beladenen Latexpartikel mehr erfolgt, also keine Rheumafaktoraktivität mehr faßbar ist. Im Gegensatz dazu war im Latex-Tropfentest nur bis zu einer Verdünnung 1:320 eine Agglutination sichtbar, also bis zu dem Titer, bei dem die optische Dichte im Überstand wieder deutlich zunimmt.

Der Vergleich der mit Rheumatikerserum gewonnenen Kurven untereinander zeigt, daß bei gleichen Inkubationszeiten die Höhe der Temperatur (37° oder 56°) keinen Einfluß auf die Vollständigkeit der Bindungsreaktion hat, wogegen Unterschiede zwischen den angewandten Inkubationszeiten bestehen. Bei einer Inkubationsdauer von 30 min besteht eine stärkere optische Dichte im Überstand, was eine weniger vollständige Bindung des Rheumafaktors an die beladenen Latexpartikel bedeutet. Bei einer Inkubationsdauer von 45 min scheint die Reaktion vollständig abgelaufen zu sein, da eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min keine weitere Verstärkung der Reaktion ergibt. Diese Ergebnisse zeigen, daß Inkubationszeiten von 45' ausreichend sind, aber nicht unterschritten werden sollten, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Eine Inkubationstemperatur von 37°C ist für eine maximale Rheumafaktor-Reaktant-Bindung ausreichend. In den folgenden Versuchen wurde dennoch bei dieser Reaktion meist 60 min mit 56° inkubiert, nicht jedoch bei Reaktionen von Inhibitor mit Reaktant, ausgenommen bestimmte Fragestellungen, bei denen eine Inaktivierung erreicht werden sollte. Die Versuchsanordnung gestattet wegen ihrer Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der exakten Ergebnisse die Verwendung für die Fragestellungen der folgenden Versuchsreihen, besonders hinsichtlich der Erfassung der inhibitorischen Aktivität von Normalseren.

Versuchsreihe 2

Mit dieser Versuchsreihe sollte eine Versuchsanordnung gefunden werden, die den Einfluß der Inhibitoren eines nativen Normalserums auf die Rheumafaktor-Reaktant-Bindung zu erfassen gestattet. Hierzu

wurde eine etwaige Reaktion von nativem Normalserum (Inhibitor) mit Reaktant bei Inkubation von 37° für 45' ermöglicht und anschließend von dem Gemisch gleiche Mengen zu den Röhrchen einer Verdünnungsreihe von Rheumatikerseren zugegeben. Nach erneuter Inkubation von 60 min bei 56° erfolgte die Weiterbearbeitung nach oben dargestellter Methode. Die Untersuchungen wurden mit Normalserumverdünnungen von 1:5 und 1:10 durchgeführt. Daneben wurde eine Standardkurve ermittelt, die den Vergleich der Ergebnisse mit der alleinigen Reaktion zwischen Rheumatikerseren und Reaktant ermöglicht.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) $60' 56^{\circ}$ (Standardkurve)

Versuch b: $[(N_{1:5} + L) 45' 37^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$

Versuch c: $[(N_{1:10} + L) 45' 37^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse (Abbildung 29) zeigen, daß das verwendete Normalserum eine deutliche Inhibition der Reaktion zwischen Rheumafaktor und Reaktant bewirkt, wenn man es zusammen mit der Latexsuspension dem Rheumatikerserum zusetzt. Nach diesen Ergebnissen kann noch nichts darüber ausgesagt werden, ob der Inhibitor bzw. die Inhibitoren mit dem Reaktanten oder mit dem Reaktor (Rheumafaktor) reagieren. Das Normalserum hat in der geringeren Verdünnung von 1:5 erwartungsgemäß eine stärkere inhibitorische Wirkung, als es bei einer Verdünnung von 1:10 der Fall ist. Dennoch haben wir die späteren Versuche, die der näheren Aufklärung der Natur und Reaktionsweise der Inhibitoren dienen sollen, meist mit der Normalserumverdünnung von 1:10 vorgenommen, um ein eventuelles ungünstiges Überwiegen des Inhibitors bei möglicherweise schwächerem Rheumafaktor zu vermeiden. Inhibitorische Wirkungen zeigen sich dann im Wesentlichen zwischen den Rheumaserum-Verdünnungen von 1:80 bis 1:1280 bei dem von uns verwendeten Referenzserum.

Versuchsreihe 3

Um die Thermolabilität bzw. Thermostabilität der Inhibitoren zu erkennen, wurden in dieser Reihe Vergleichsuntersuchungen mit nativem

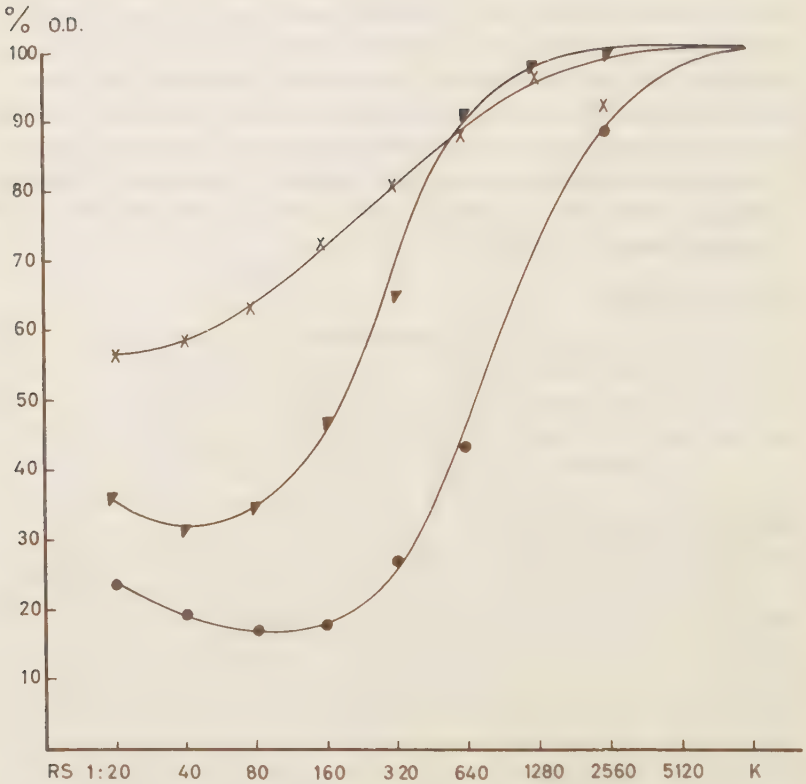


Abbildung 29

- = Versuch 2a
- × = Versuch 2b
- ▼ = Versuch 2c

Einfluß von nativem Normalserum (1:5 und 1:10) auf die durch Rheumatikerserum bei Zugabe zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Normalserum wurde mit Latexsuspension vor Zugabe verschiedener Rheumatikerserumverdünnungen inkubiert. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 2 angegebenen Versuchsanordnungen.

und inaktiviertem (30' 56°) Normalserum, bei sonst gleicher Versuchsanordnung wie in Versuchsreihe 2, durchgeführt. Es wurden ebenfalls Normalserum-Verdünnungen von 1:5 und 1:10 verwendet.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

Versuch b: $\left[\left(N_{1:5}^{\text{nativ}} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch c: $\left[\left(N_{1:5}^{\text{inakt.}} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch d: $\left[\left(N_{1:10}^{\text{nativ}} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch e: $\left[\left(N_{1:10}^{\text{inakt.}} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Der Vergleich der einzelnen Versuchsreihen, deren Ergebnisse in den Abbildungen 30 und 31 (aufgeteilt nach Untersuchungen mit den Normalserumverdünnungen von 1:5 bzw. 1:10) angegeben sind, zeigt, daß bei Inaktivierung der Normalseren die Inhibitionswirkung deutlich geringer, jedoch nicht aufgehoben wird. Die Ursache könnte in einer nicht vollständigen Inaktivierung des hitzelabilen Inhibitors oder, was wahrscheinlicher ist, in der Wirkung eines zusätzlichen hitzestabilen Inhibitors zu suchen sein.

Versuchsreihe 4

In den folgenden Reihen wurde versucht, die Reaktionsweise der Inhibitoren im nativen Normalserum näher aufzuklären. In dieser Versuchsreihe 4 wurde zunächst untersucht, welche Unterschiede in den Ergebnissen durch eine verschiedene Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer zum Reaktionssystem auftreten. Es wurden nur Nativseren verwandt, um den hitzelabilen Inhibitor mit zu erfassen. Die Versuche wurden mit Normalserumverdünnungen von 1:5 und 1:10 durchgeführt.

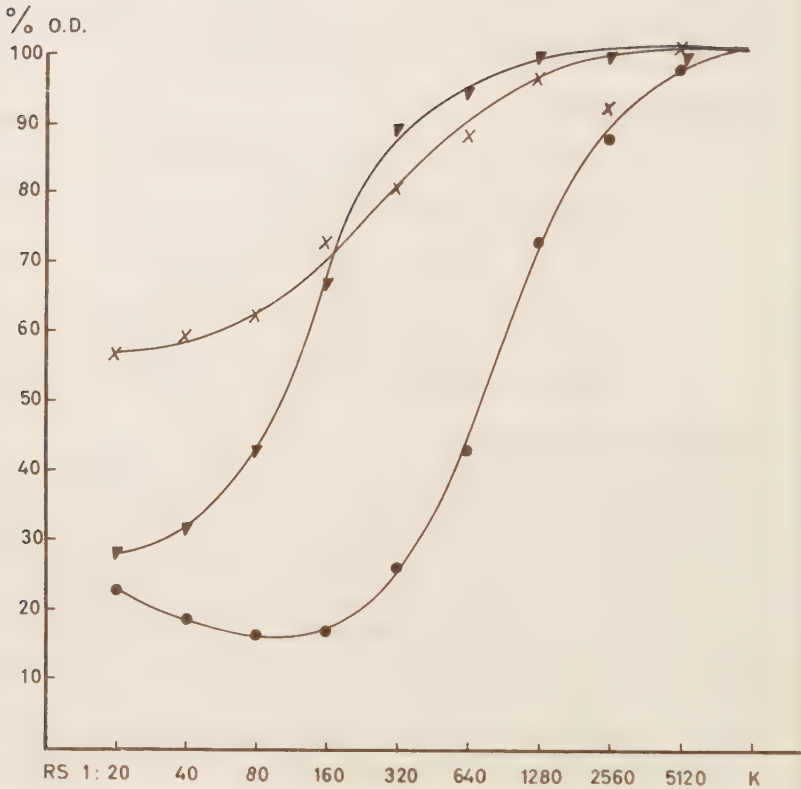


Abbildung 30

- = Versuch 3a
- x = Versuch 3b
- ▼ = Versuch 3c

Einfluß von nativem und inaktiviertem Normalserum (1:5) auf die durch Rheumatikerserum bei Zugabe zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Normalserum wurde mit Latexsuspension vor Zugabe verschiedener Rheumatikerserumverdünnungen inkubiert. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 3 angegebenen Versuchsanordnungen.

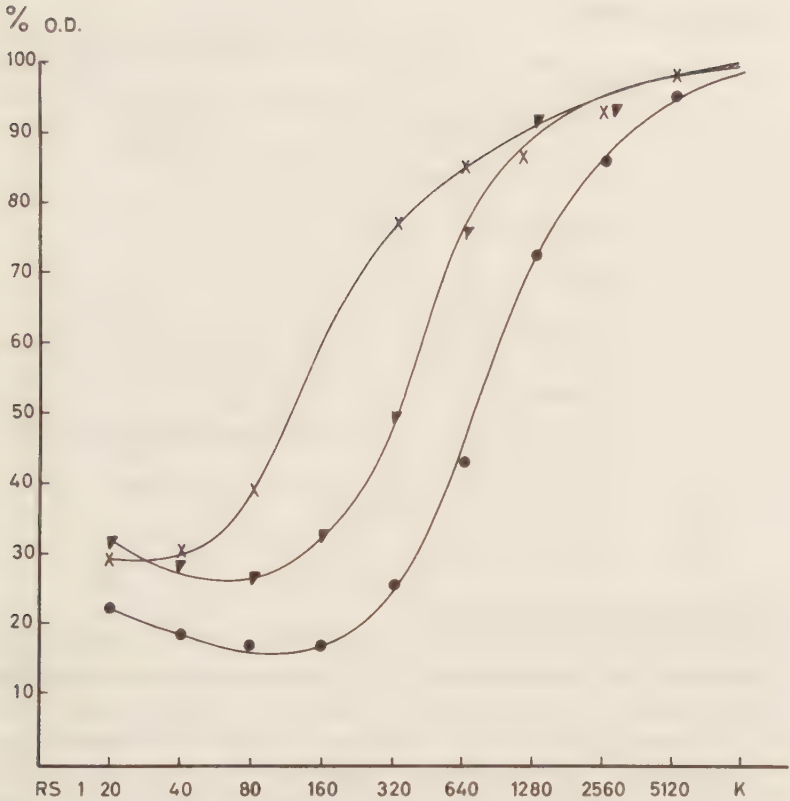


Abbildung 31

- = Versuch 3a
- × = Versuch 3d
- ▼ = Versuch 3e

Einfluß von nativem und inaktiviertem Normalserum (1:10) auf die durch Rheumatiker Serum bei Zugabe zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Normalserum wurde mit Latexsuspension vor Zugabe verschiedener Rheumatiker Serumverdünnungen inkubiert. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 3 angegebenen Versuchsanordnungen.

Versuchsordnung

Versuch a: $(R + L) \quad 45' \quad 37^{\circ}$ (Standardkurve für b-g)

Versuch b: $[(N_{1:5} + L) \quad 45' \quad 37^{\circ} + R] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch c: $[(N_{1:5} + R) \quad 45' \quad 37^{\circ} + L] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch d: $[(R + L) \quad 45' \quad 37^{\circ} + N_{1:5}] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch e: $[(N_{1:10} + L) \quad 45' \quad 37^{\circ} + R] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch f: $[(N_{1:10} + R) \quad 45' \quad 37^{\circ} + L] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch g: $[(R + L) \quad 45' \quad 37^{\circ} + N_{1:10}] \quad 45' \quad 37^{\circ}$

Versuch h: $(R + L) \quad 60' \quad 56^{\circ}$ (Standardkurve für i-k)

Versuch i: $[(R + N_{1:10}) \quad 45' \quad 37^{\circ} + L] \quad 60' \quad 56^{\circ}$

Versuch k: $[(N_{1:10} + L) \quad 45' \quad 37^{\circ} + R] \quad 60' \quad 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen 32-34 dargestellt. Gegenüber den Standardkurven mit der vollen Agglutinationsreaktion durch Rheumatikerserum ergibt die Zugabe von nativem Normalserum eine deutliche Inhibition, nicht nur, wie bereits in Versuchsreihe 2 gezeigt, wenn man zunächst Normalserum mit Reaktant inkubiert, sondern auch, wenn zuerst Normalserum und Rheumatikerserum inkubiert werden. Daß bei höherer Normalserum-Konzentration (1:5) die Inhibition etwas stärker ist, wenn zuerst Normalserum mit Latexsuspension statt mit Rheumatikerserum inkubiert wird, gegenüber dem Befund mit geringerer Normalserum-Konzentration (1:10), bei der die primäre Inkubation von Normalserum mit Rheumatikerserum eine etwas stärkere Inhibition ergibt, mag an den veränderten Mengenverhältnissen der Reaktionsteilnehmer liegen. Dagegen ist nur eine geringe Inhibition sichtbar, wenn Rheumatikerserum (Rheumafaktor) bereits mit Reaktant reagierte. Die Tatsache, daß die Inhibition auftritt, wenn zunächst Normalserum mit der Latexsuspension zusammengegeben wurde und dann Rheumatikerserum zugefügt wurde, könnte dafür sprechen, daß der Inhibitor mit dem Reaktanten reagiert und dort Stellen besetzt, die dann nicht mehr mit dem Rheumafaktor reagieren können. Dann müßte

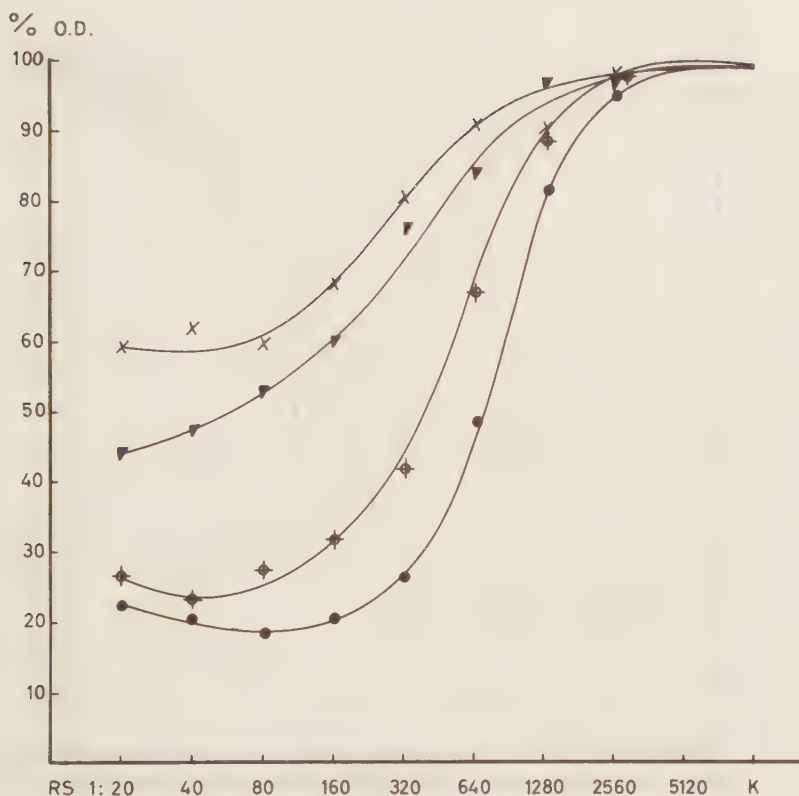


Abbildung 32

- = Versuch 4a
- x = Versuch 4b
- ▼ = Versuch 4c
- ⊕ = Versuch 4d

Einfluß von nativem Normalserum (1:5) auf die durch Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Unterschiede dieser Beeinflussung bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 4 angegebenen Versuchsanordnungen.

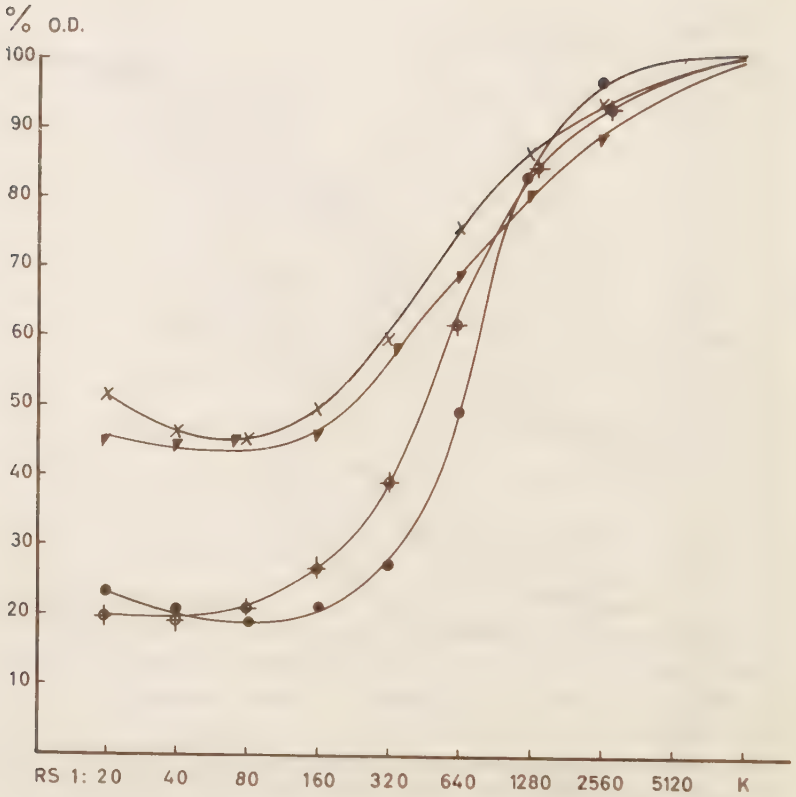


Abbildung 33

- = Versuch 4a
- × = Versuch 4e
- ▼ = Versuch 4f
- ⊕ = Versuch 4g

Einfluß von nativem Normalserum (1:10) auf die durch Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Unterschiede dieser Beeinflussung bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 4 angegebenen Versuchsanordnungen.

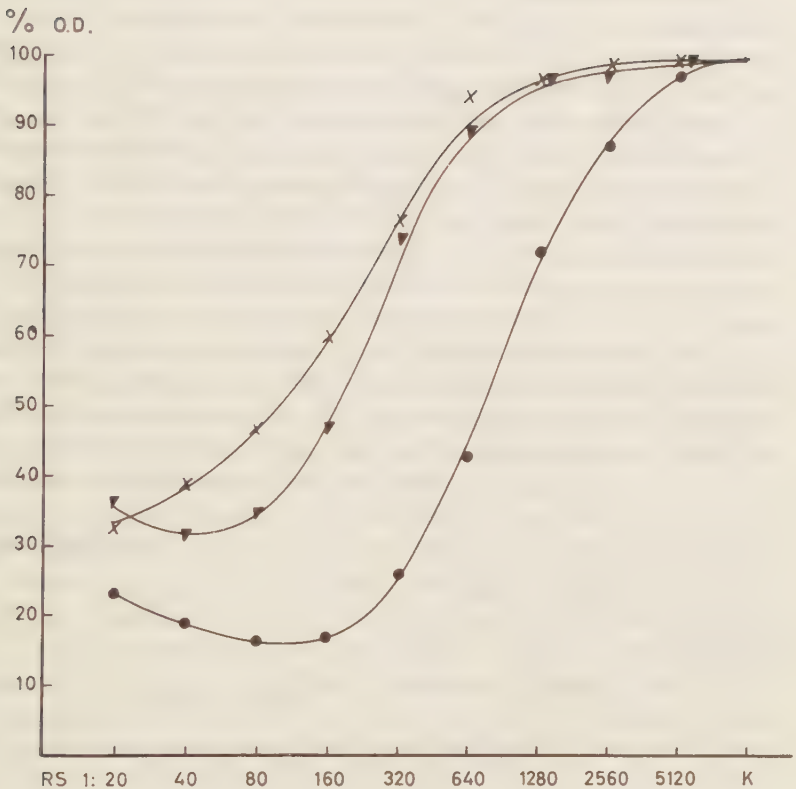


Abbildung 34

- = Versuch 4h
- × = Versuch 4i
- ▼ = Versuch 4k

Einfluß von nativem Normalserum (1:10) auf die durch Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltene Agglutinationskurve. Unterschiede dieser Beeinflussung bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer. Gegenüber Abbildung 32 und 33 Veränderung der Inkubationszeit und -dauer bei der letzten Reaktion. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 4 angegebenen Versuchsanordnungen.

man allerdings annehmen, daß bei gleichzeitiger Zugabe von Normalserum und Rheumatiker Serum zur Latexsuspension der Inhibitor eine größere Affinität zum Reaktanten besitzt und schneller reagiert als der Rheumafaktor. Oder aber der Inhibitor reagiert nicht nur mit dem Reaktanten sondern auch oder ausschließlich mit dem Rheumafaktor, im letzten Falle auch dann, wenn zuerst Normalserum mit Latexsuspension zusammengegeben wurde, wobei es dann nicht zu einer Reaktion zwischen diesen käme. Diese Fragen bedurften in weiteren Versuchsreihen der Klärung. Sicher ist jedoch, daß Inhibitoren (besonders bei der Normalserumverdünnung von 1:10) nur noch schwach wirksam sind, wenn der Rheumafaktor durch Reaktion mit dem Reaktanten bereits zur Agglutination der Latexpartikel geführt hat. Die geringe Restinhibition bei anfänglicher Reaktion von Rheumafaktor und beladenen Latexpartikeln vor Zugabe von Normalserum ist nicht leicht zu erklären. Jedenfalls wurde bei dieser Versuchsanordnung nie der Agglutinationsgrad erreicht, wie er bei alleiniger Reaktion von Rheumatiker Serum und beladenen Latexpartikeln auftritt. Die nachträgliche Zugabe von Normalserum muß also noch eine geringe inhibitorische Wirkung ausüben können, was sich schon darin zeigt, daß diese Inhibition bei einer Normalserum-Verdünnung von 1:5 stärker ist als bei einer solchen von 1:10. Ob hier unaggregiertes γ -Globulin, wie von C h r i s t i a n ¹⁵ für den Präzipitintest beschrieben, eine Rolle spielt, ist zu diskutieren. Zumindest berichtete E p s t e i n (zit. ¹⁵), daß unaggregiertes γ -Globulin in der Lage ist, bereits gebildete Präzipitate wieder zu lösen.

Versuchsreihe 5

Wir haben in Versuchsreihe 3 gezeigt, daß die durch den hitzelablen Inhibitor hervorgerufene Inhibition vermutlich durch die Wirksamkeit eines hitzestabilen Inhibitors geringer wird, wenn man statt des nativen inaktiviertes Normalserum zur Latexsuspension vor Zufügung des Rheumatiker Serums gibt. Die Inhibition durch inaktiviertes Normalserum ist stärker als die in Versuchsreihe 4 diskutierte schwache Inhibition durch unaggregiertes γ -Globulin, kann also nicht durch diese hervorgerufen sein, zumal, wie wir später sehen werden, durch Inaktivierung zumindest ein Teil der unaggregierten γ -Globuline in einen Aggregatzustand übergeht. Wenn wir in Versuchsreihe 4 diskutierten, ob der hitzelabile Inhibitor möglicherweise nicht mit dem Reaktanten sondern

mit dem Rheumafaktor reagiert, müßte durch Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension für 30 min bei 56°C nach Inkubation für 45 min bei 37°C der hitzelabile Inhibitor wirkungslos und bei anschließender Zugabe von Rheumatikerserum die Inhibition geringer als bei nicht inaktiviertem Gemisch von Normalserum und Latexsuspension werden. Der Klärung dieser Frage dienten die Versuche dieser Versuchsreihe. Neben einer Standard-Agglutinationskurve (a) und Standard-Inhibitionskurve (b) wurde die Bestimmung der Verhältnisse der Inhibitionsaktivität nach Inaktivierung des Normalserums (30 min für 56°C) vor Zugabe zur Latexsuspension und schließlicher Zufügung zum Rheumatikerserum aufgezeichnet. Diesen Ergebnissen waren die Befunde gegenüberzustellen, wie sie erhalten werden, wenn man das Normalserum-Latexsuspensionsgemisch nach oder auch ohne Inkubation (45 min bei 37°C) inaktiviert (30 min bei 56°C) und erst dann Rheumatikerserum zugibt. Als Normalserum wurde in allen Versuchen eine Verdünnung von 1:10 verwendet.

Versuchsanordnung

- Versuch a: (R + L) 60' 56° (Standard-Agglutination)
- Versuch b: $[(N^{\text{nativ}} + L) 45' 37^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$ (Standard-Inhibition)
- Versuch c: $[(N^{\text{inakt.}} + L) 45' 37^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$
- Versuch d: $[(N^{\text{nativ}} + L) \begin{smallmatrix} 45' & 37^{\circ} \\ 30' & 56^{\circ} \end{smallmatrix} + R] 60' 56^{\circ}$
- Versuch e: $[(N^{\text{nativ}} + L) 30' 56^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse (Abbildung 35) zeigen, daß nach Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension ohne oder nach vorheriger Inkubation die Inhibition der Agglutinationsreaktion nachfolgend zugefügten Rheumatikerserums nicht geringer sondern eher verstärkt wird. Das bedeutet, daß eine Reaktion zwischen hitzelabilem Inhibitor und Reaktant stattgefunden haben muß, ehe inaktiviert wurde. Diese Reaktion kann dann durch Erhitzen auf 56°C nicht mehr im Sinne einer Inaktivierung des Inhibitors beeinflußt werden. Da die Ergebnisse die gleichen sind, ob vor dem Inaktivierungsversuch inkubiert wurde oder nicht, kann angenommen werden, daß die Reaktion zwischen Inhibitor und Reaktant sehr rasch und leicht abläuft. Die in Ver-

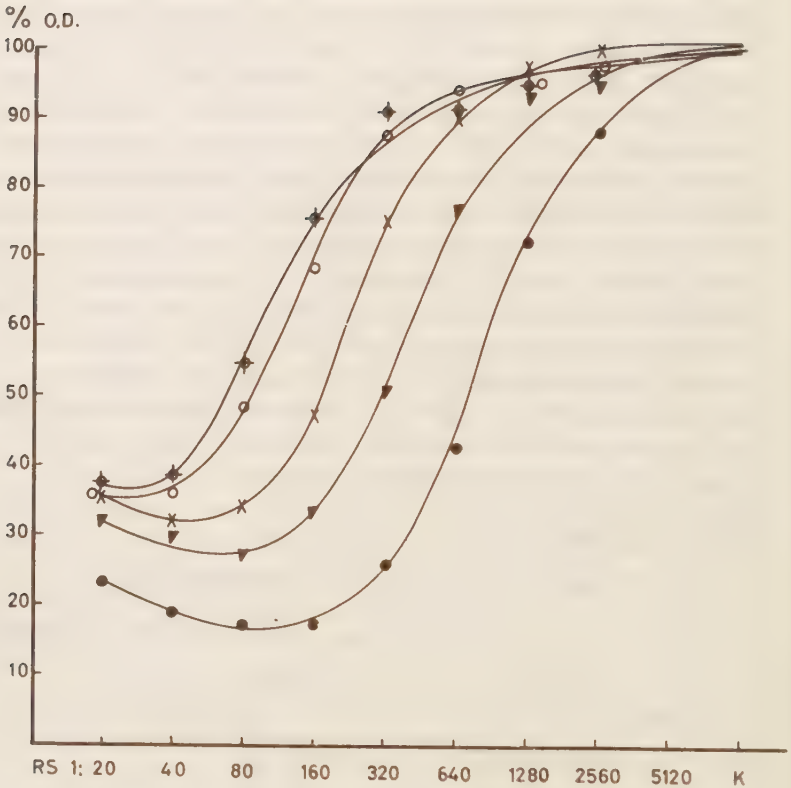


Abbildung 35

- = Versuch 5a
- × = Versuch 5b
- ▼ = Versuch 5c
- ◆ = Versuch 5d
- = Versuch 5e

Unterschiede in der Beeinflussung der bei Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erzielten Agglutinationskurve durch natives und inaktiviertes Normalserum bzw. durch Inaktivierung des Gemisches von nativem Normalserum und Latexsuspension. Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer: zunächst Reaktion von Normalserum mit Latexsuspension, dann Zugabe von Rheumatikerserum in verschiedenen Verdünnungen. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 5 angegebenen Versuchsanordnungen.

Versuchsreihe 4 gestellte Frage, ob der hitzelabile Inhibitor mit dem Reaktanten reagiert und dort Stellen besetzt, mit denen der Rheumafaktor dann nicht mehr reagieren kann, muß also positiv beantwortet werden. Ob außerdem eine Reaktion zwischen Inhibitor und Rheumafaktor möglich ist, muß noch untersucht werden. Auch ist noch zu klären, warum die Inhibition nach Erhitzen (30 min 56°C) des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension stärker ist als bei der üblichen Reaktion mit nicht inaktiviertem Gemisch der Reaktionsteilnehmer. Auf diese Fragestellungen wird in weiteren Versuchsreihen eingegangen.

Versuchsreihe 6

Mit den Untersuchungen dieser Versuchsreihe sollte die Frage beantwortet werden, ob möglicherweise auch eine Reaktion zwischen hitzelabilem Inhibitor und Rheumafaktor zustandekommt. Es war deshalb, entsprechend der Versuchsanordnung in Versuchsreihe 5, nach Mischung und Inkubation (45 min bei 37°C) von nativem Normalserum und Rheumatikerserum zu inaktivieren (30 min bei 56°C) und danach Latexsuspension zuzugeben. Die hierbei erzielten Ergebnisse waren mit den Ergebnissen bei gleicher Versuchsanordnung, jedoch ohne Inaktivierung (Standard-Inhibitionskurve) sowie mit der Standard-Agglutinationskurve zu vergleichen. Daneben wurden vergleichsweise die Ergebnisse aufgezeichnet, die erhalten wurden, wenn inaktiviertes Normalserum (30 min bei 56°C) mit Rheumatikerserum gemischt und inkubiert worden war, bevor Latexsuspension zugefügt wurde. Bei dieser Versuchsanordnung ist der hitzelabile Inhibitor bei sonst gleicher Versuchsanordnung wie oben mit Sicherheit inaktiviert. Alle Normalseren wurden in der Verdünnung 1:10 verwendet.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) $60'$ 56° (Standardagglutination)

Versuch b: $\left[\text{N}^{\text{nativ}} + \text{L} \right] 45' 37^{\circ} + \text{R} \left] 60' 56^{\circ} \right.$

Versuch c: $\left[\text{N}^{\text{inakt.}} + \text{R} \right] 45' 37^{\circ} + \text{L} \left] 60' 56^{\circ} \right.$

Versuch d: $[(N^{\text{nativ}} + R) \begin{smallmatrix} 45' & 37^{\circ} \\ & + L \end{smallmatrix}] \begin{smallmatrix} 60' & 56^{\circ} \end{smallmatrix}$

Versuch e: $[(N^{\text{nativ}} + R) \begin{smallmatrix} 45' & 37^{\circ} \\ 30' & 56^{\circ} \end{smallmatrix} + L] \begin{smallmatrix} 60' & 56^{\circ} \end{smallmatrix}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuche zeigen (Abbildung 36), daß bei Inaktivierung des Gemisches von Normalserum mit Rheumatiker Serum vor Zugabe des Reaktanten die Inhibition nicht zurückgeht. Wenn man annehmen wollte, daß der hitzelabile Inhibitor nicht mit Rheumafaktor sondern nur mit dem Reaktanten reagiert, müßte die Inhibition deutlich geringer werden und auf den Wert der inhibitorischen Aktivität des hitzestabilen Inhibitors zurückgehen. Dieser Befund spricht eindeutig dafür, daß der hitzelabile Inhibitor genauso wie mit Reaktant auch mit Rheumafaktor reagieren kann.

Die Inhibition wurde jedoch gegenüber dem Versuch ohne Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Rheumatiker Serum nicht verstärkt wie es in Versuchsreihe 5 bei Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension der Fall war. Eine Erklärung für diese Verhaltensdifferenz kann vorläufig nicht gegeben werden und ist später zu diskutieren.

Versuchsreihe 7

Wir haben in den vorangehenden Versuchsreihen klären können, daß die Inhibitoren des Normalserums mit Rheumafaktor reagieren. Die Gegenüberstellung der Befunde dieser Versuchsreihe, deren Ergebnisse in früheren Reihen teilweise bereits enthalten waren, sollen zeigen, welcher Anteil der inhibitorischen Aktivität möglicherweise auf einen hitzestabilen Inhibitor entfällt. Nur durch diese Gegenüberstellung ist zu zeigen, daß mit Sicherheit der hitzelabile Inhibitor auch mit Rheumafaktor reagiert. Es wurden deshalb Mischungen von Rheumatiker Serum sowohl mit nativem als auch mit inaktiviertem (30 min bei 56°C) Normalserum (1:10) inkubiert und anschließend Latexsuspension zugegeben.

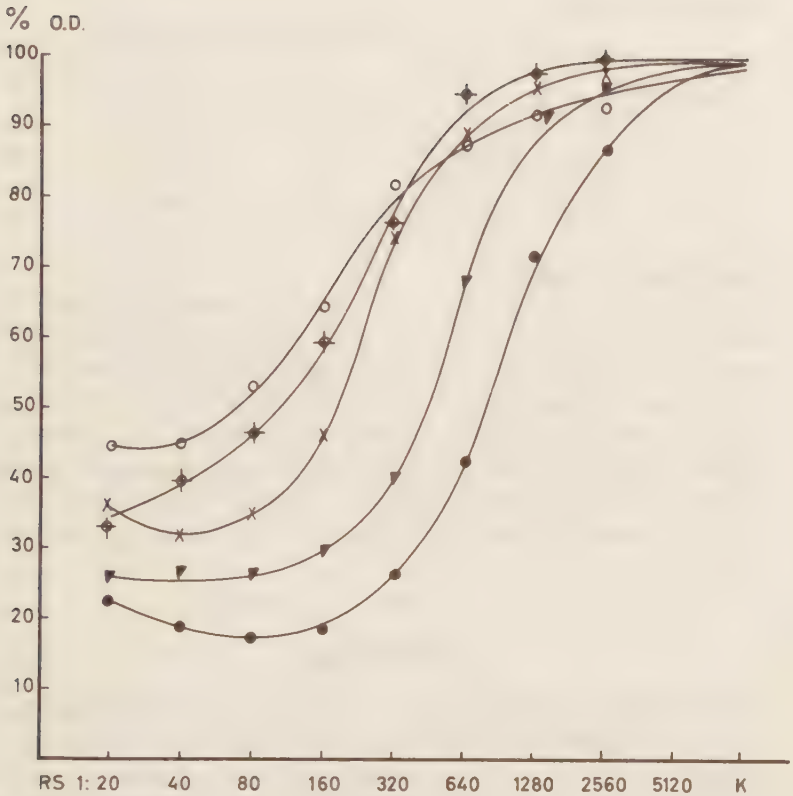


Abbildung 36

- = Versuch 6a
- × = Versuch 6b
- ▼ = Versuch 6c
- ⊕ = Versuch 6d
- = Versuch 6e

Unterschiede in der Beeinflussung der bei Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erzielten Agglutinationskurve durch natives und inaktiviertes Normalserum bzw. durch Inaktivierung des Gemisches von nativem Normalserum und Rheumatikerserum. Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer: zunächst Reaktion von Normalserum mit Rheumatikerserum in verschiedenen Verdünnungen, dann Zugabe von Latexsuspension. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 6 angegebenen Versuchsanordnungen.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) 60' 56° (Standardagglutination)

Versuch b: $\left[(N^{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch c: $\left[(N^{\text{inakt.}} + R) 45' 37^{\circ} + L \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch d: $\left[(N^{\text{nativ}} + R) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \\ 30' & 56^{\circ} \end{matrix} + L \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Wenn inaktiviertes Normalserum, das also nur hitzestabilen Inhibitor enthalten kann, mit Rheumatiker Serum nach Mischung inkubiert und dann mit Latexsuspension gemischt und inkubiert wird, wird die Inhibition deutlich geringer gegenüber den Versuchen mit oder ohne Inaktivierung erst nach der Mischung von nativem Normalserum mit Rheumatiker Serum. Diese Ergebnisse zeigen, daß hitzelabiler Inhibitor (in der Versuchsanordnung der Reihe 6) mit Sicherheit mit Rheumafaktor reagierte.

Versuchsreihe 8

Die folgenden Versuchsreihen sollen eine Diskussion der Reaktionsweise des hitzestabilen Inhibitors ermöglichen. Es wurden also der Inhibitionskurve mit nativem Normalserum (1:10) solche mit inaktiviertem (30 min bei 56°C) Normalserum (1:10) gegenübergestellt. Dabei wurde das inaktivierte Normalserum einmal zuerst mit Latexsuspension, und zum anderen zunächst mit Rheumatiker Serum zusammengegeben und inkubiert. Darauf erfolgte Zugabe von Rheumatiker Serum bzw. Latexsuspension mit anschließender Inkubation.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) 60' 56° (Standardagglutination)

Versuch b: $\left[(N^{\text{inakt.}} + L) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

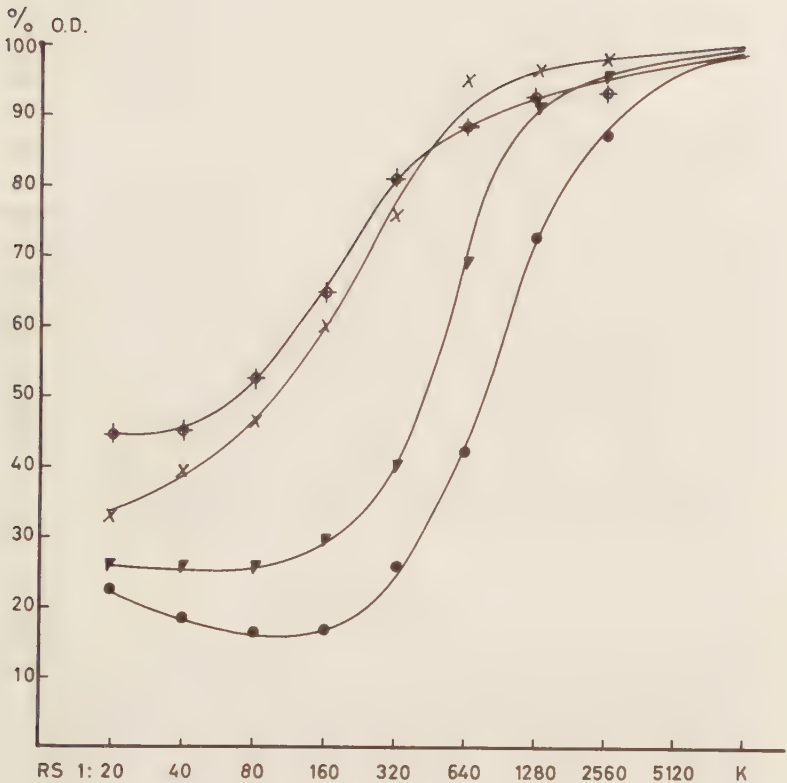


Abbildung 37

- = Versuch 7a
- × = Versuch 7b
- ▼ = Versuch 7c
- ◆ = Versuch 7d

Vergleich der Beeinflussung der bei Zugabe von Rheumatiker Serum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erzielten Agglutinationskurve durch Inaktivierung des Gemisches von nativem Normalserum und Latexsuspension. Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer: zunächst Reaktion von Normalserum mit Latexsuspension, dann Zugabe von Rheumatiker Serum in verschiedenen Verdünnungen. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 7 angegebenen Versuchsanordnungen.

Versuch c: $\left[(N^{\text{inakt.}} + R) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \end{matrix} + L \right] \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$

Versuch d: $\left[(N^{\text{nativ}} + L) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \end{matrix} + R \right] \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$

Versuch e: $\left[(N^{\text{nativ}} + R) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \end{matrix} + L \right] \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$

Besprechung der Ergebnisse

Es hatte sich in früheren Versuchsreihen bereits gezeigt, daß die Inhibition nach Inaktivierung des hitzelablen Inhibitors deutlich geringer ist als bei nativem Normalserum mit aktivem hitzelabilem Inhibitor. Diese Ergebnisse werden auch bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer in dieser Versuchsreihe bestätigt (Abbildung 38). Möglicherweise ist die inhibitorische Aktivität des hitzestabilen Inhibitors etwas stärker, wenn zunächst Normalserum mit Latexsuspension zusammengegeben werden. Es ist jedoch schwer, eine Aussage über seine wahrscheinliche Reaktionsweise zu machen, da mit der angewandten Versuchsanordnung keine Möglichkeit gegeben ist, den hitzestabilen Inhibitor auszuschalten.

Versuchsreihe 9

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich die Inhibition des Normalserums zu verstärken scheint, wenn natives Normalserum (1:10) nach Mischung mit Latexsuspension durch Erhitzen inaktiviert wird. Es sollen deshalb hier nochmals die entsprechenden Ergebnisse gegenübergestellt werden. Daneben sollte betrachtet werden, welchen Einfluß die Erhitzung auf das Gemisch von nativem Normalserum und Rheumatikerserum vor Zugabe von Latexsuspension im Sinne einer etwaigen Verstärkung der inhibitorischen Potenz ausübt.

Versuchsanordnung

Versuch a: $(R + L) \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$ (Standardagglutination)

Versuch b: $\left[(N + L) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \end{matrix} + R \right] \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$

Versuch c: $\left[(N + L) \begin{matrix} 45' & 37^{\circ} \\ 30' & 56^{\circ} \end{matrix} + R \right] \begin{matrix} 60' & 56^{\circ} \end{matrix}$

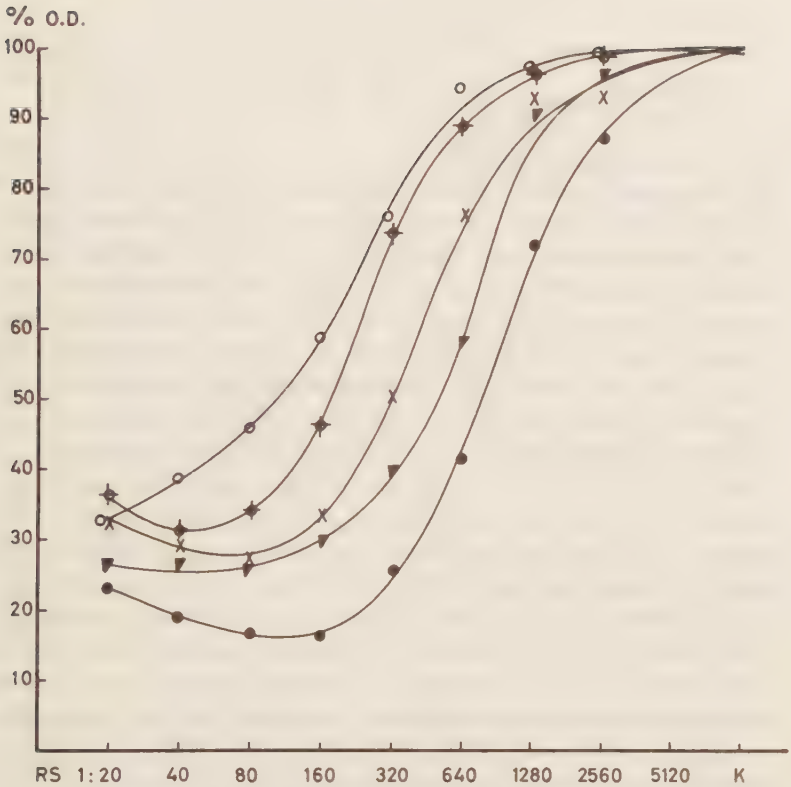


Abbildung 38

- = Versuch 8a
- x = Versuch 8b
- ▼ = Versuch 8c
- ⊕ = Versuch 8d
- = Versuch 8e

Beeinflussung der bei Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln durch inaktiviertes Normalserum bei unterschiedlicher Reihenfolge des Reaktionsteilnehmers. Vergleich mit gleicher Versuchsanordnung, nur mit nativem statt inaktiviertem Normalserum. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 8 angegebenen Versuchsanordnungen.

Versuch d: $[(N + L) \text{ } 30' \text{ } 56^{\circ} + R] 60' \text{ } 56^{\circ}$

Versuch e: $[(N + R) \text{ } 45' \text{ } 37^{\circ} + L] 60' \text{ } 56^{\circ}$

Versuch f: $[(N + R) \text{ } 45' \text{ } 37^{\circ} \text{ } 30' \text{ } 56^{\circ} + L] 60' \text{ } 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind aus Abbildung 39 und 40 ersichtlich. Es bestätigt sich, daß die Inhibition des nativen Normalserums deutlich verstärkt wird, wenn dieses nach Reaktion mit Reaktant (vor Zugabe von Rheumatikerserum) inaktiviert wird. Dieses Ergebnis spricht also nicht nur dafür, daß zumindest der hitzelabile Inhibitor mit Reaktant reagiert hat (Versuchsreihe 5), sondern daß durch die Erhitzung auf 56°C eine zusätzliche inhibitorische Potenz aktiviert wurde. Wir diskutieren, ob es sich hier um den sog. "hitzestabilen" Inhibitor handelt, der sich nach R a n t z und Mitarbeitern¹¹³ sowie D e i c h e r²¹ im γ -Globulinbereich findet. Das würde bedeuten, daß natives Normalserum lediglich einen hitzelabilen Inhibitor und keinen "hitzestabilen" Inhibitor enthält. Dieser würde dann erst durch Erhitzen auf 56°C entstehen. Da Rheumafaktor auch mit γ -Globulin reagiert, das nicht an Trägersubstanzen angelagert ist, vorausgesetzt, daß es eine Veränderung erfährt, also z.B. erhitzt wird^{30, 65, 94}, erscheint es durchaus möglich, daß erst durch Erhitzen des Normalserums Aggregate entstehen, die eine Reaktion mit dem Rheumafaktor ermöglichen, zur Präzipitation führen und somit einen Teil der Rheumafaktormengen von der Bindung an die beladenen Latexpartikel abstrahieren. Sollte diese Hypothese zutreffen, dann käme nur eine Reaktion des "hitzestabilen" Inhibitors mit Rheumafaktor und nicht mit den beladenen Latexpartikeln in Frage. Die "Inhibition" durch den "hitzestabilen" Inhibitor ist relativ gering (siehe Versuchsreihe 3 und 7). Im Falle der Aktivierung des "hitzestabilen" Inhibitors durch Aggregation nach erfolgter Reaktion des hitzelabilen Inhibitors müßte dann die Gesamtinhibition etwa um den Betrag der inhibitorischen Aktivität des "hitzestabilen" Inhibitors gegenüber der des hitzelabilen Inhibitors zugenommen haben, was in unseren Ergebnissen auch der Fall ist. Das gilt jedoch nur für die Erhitzung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension vor Zugabe des Rheumatikerserums. Erhitzt man die Mischung von Normalserum mit Rheumatikerserum vor Zugabe der Latexsuspension, so verstärkt sich die Inhibition der Agglutinationswirkung des Rheumafaktors

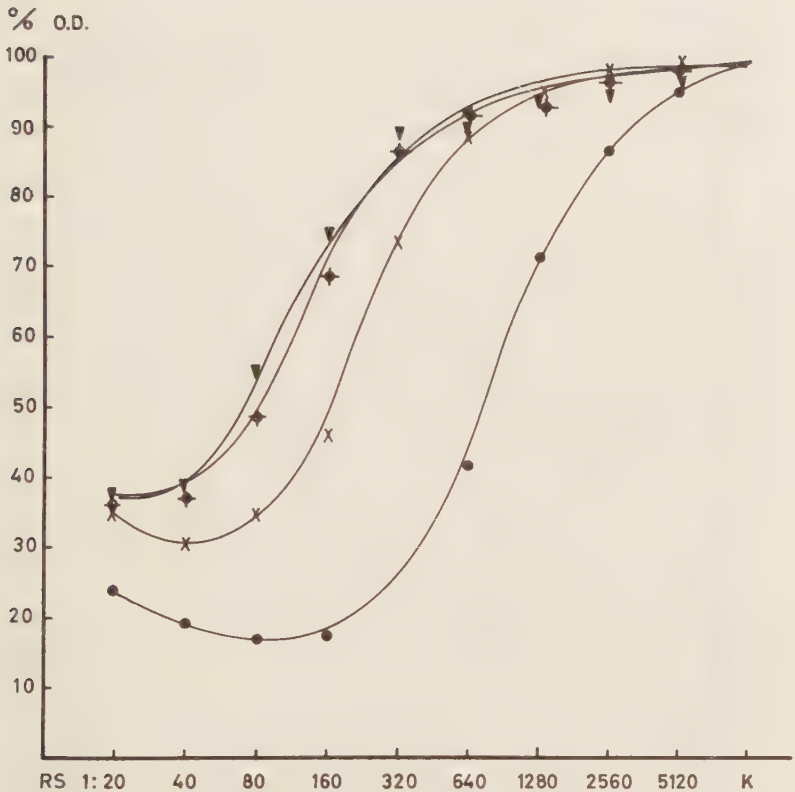


Abbildung 39

- = Versuch 9a
- x = Versuch 9b
- ▼ = Versuch 9c
- ◆ = Versuch 9d

Vergleich der Beeinflussung der Agglutinationsreaktion durch Zugabe eines inaktivierten bzw. nicht inaktivierten Gemisches von nativem Normalserum und Suspension beladener Latexpartikel zu Rheumatikerserum in verschiedenen Verdünnungen. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 9 angegebenen Versuchsanordnungen.

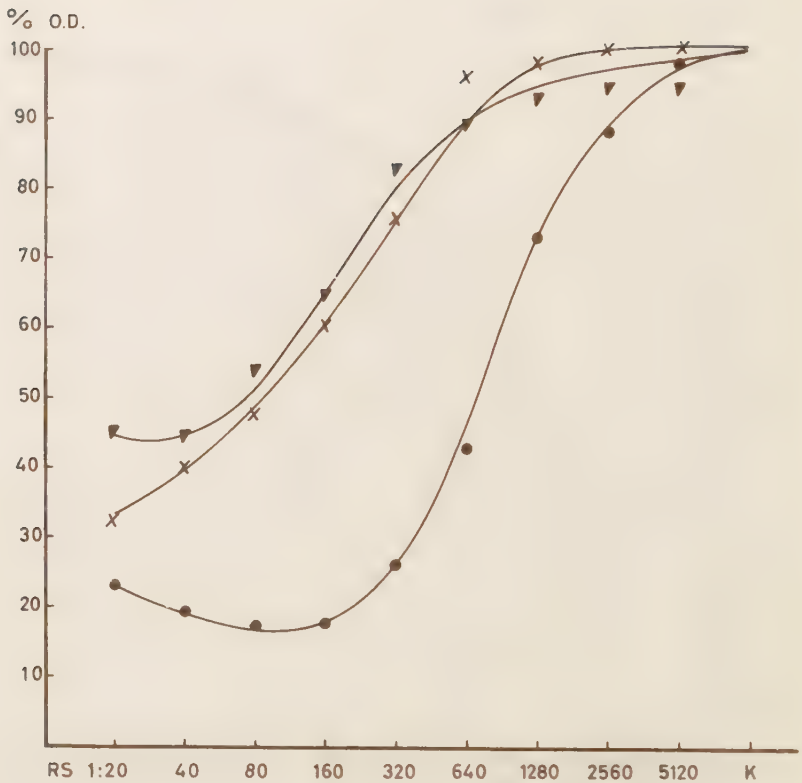


Abbildung 40

- = Versuch 9a
- × = Versuch 9e
- ▼ = Versuch 9f

Vergleich der Beeinflussung der Agglutinationsreaktion durch Zugabe eines inaktivierten bzw. nicht inaktivierten Gemisches von nativem Normalserum und Rheumatiker-serum in verschiedenen Verdünnungen zur Latexsuspension. Die Versuchsbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen in Versuchsreihe 9 angegebenen Versuchsanordnungen.

nicht unerheblich. Infolge der Voraussetzung, daß die oben charakterisierte "Inaktivierung des rheumatischen Inhibitors" durch Erhitzen des Normalserums der Rheumatiser entspricht, kann dieses nur so gedeutet werden, daß die bereits erfolgte Reaktion des hitzelablen Inhibitors mit dem Rheumafaktor sowie der bewußt fehlende Beeinträchtigung durch den "inaktivierten" Inhibitor mehr zutrifft, da offensichtlich der "hitze-stabile" Inhibitor schwächer wirksam ist und nur noch wenige vom hitzelablen Inhibitor unteretzte Anteile des Rheumafaktors frei sind. Bei der Reaktion zwischen hitzelablen Inhibitor und beladenem Antikörperkorn kommt dagegen ein partieller Rücktreten des Rheumafaktors durch Erhitzen nicht geschehen. "Inaktivierter" Inhibitor zersetzt wirksam werden und noch genügend von hitzelablen Inhibitor unteretzte Anteile des Rheumafaktors vorfinden. Es ist jedoch anzusetzen, daß es sich hier um einen wenig begründeten Erklärungsversuch für das obenstehende Verhalten handelt. Dennoch erscheint die Ursache der Inaktivierung eines sog. "hitze-stabilen" Inhibitors durch Aggregation mit γ -Globulin charakteristisch. Berücksichtigt man die Beobachtung von De la Motte ²¹, daß sich in elektrolytisch getriebener γ -Globulinselektrophorese ein Inhibitor findet, der als "hitze-stabil" durch Erhitzen wesentlich gestärkt wird und dessen Aggregationszustand wahrscheinlich ist, so scheint sich prinzipiell annehmen, daß die obenstehende Auffassung nicht viel. Es ist nicht anzunehmen, daß im untersuchten Blut γ -Globulin in wesentlicher Menge im Aggregationszustand vorhanden ist. Die Aggregation wird durch Ionisierung bei 50°C oder, wie später zu sehen ist, auch besser durch Erhitzen auf 65°C verursacht. Dennoch ist es möglich, daß bei der Auftrennung des Serums durch die Affektion geringer γ -Globulin-Mengen stattfindet. Diese dürfte besonders bei elektrolytischer Auftrennung des Serums, wie die De la Motte ²¹ vornimmt, der Fall sein. Dabei ist es nicht ausgeschlossen, daß bei der Auftrennung der Serumproteine γ -Globulin-Aggregate in ihrer Wanderung etwas von nicht aggregierten γ -Globulinen abweichen, wodurch De la Motte ²¹ eine Trennung des γ -Globulin-Inhibitors in eine Fraktion, die erst durch Erhitzen inaktiviert werden kann, und eine, die bereits vor Erhitzen inaktiviert ist, nicht aber durch Erhitzen wesentlich steigert, vornehmen konnte. Es stellt in jedem Falle bei der Feststellung, daß die Voraussetzung für einen hitze-stabilen Inhibitor der Aggregationszustand des γ -Globulins ist, der im Geblut und auch in unserer Versuchsanordnung mit Verfestigung der Normalsera selbst nach der

Entnahme ohne physikalische Eingriffe (abgesehen von der Zentrifugation erst nach erfolgter Reaktion) weniger wahrscheinlich ist, als z.B. bei elektrophoretischer Serumauftrennung. Damit wäre dann allerdings die Existenz eines echten hitzestabilen Inhibitors fraglich. Es würde sich dann um nichts anderes als einen zusätzlichen Reaktanten zu den beladenen Latexpartikeln handeln.

Versuchsreihe 10

Daß der Aggregatzustand des "hitzestabilen" Inhibitors erforderlich ist, läßt sich noch an einem weiteren Beispiel zeigen. Wir versuchten, durch nochmaliges Erhitzen für 5 min auf 63°C im Anschluß an die übliche Inaktivierung (30 min 56°C) die Aggregation zu verstärken und das Ausmaß der Inhibition zu untersuchen.

Versuchsanordnung

Versuch a: (R + L) 60' 56° (Standardagglutination)

Versuch b: $\left[(N^{30' 56^{\circ}} + L) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch c: $\left[(N^{30' 56^{\circ}}_{5, 63^{\circ}} + L) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Versuch d: $\left[(N^{\text{nativ}} + L) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die in Abbildung 41 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen die bereits bekannte, gegenüber nativem Serum (hitzelabiler Inhibitor) schwächere inhibitorische Wirkung des Normalserums nach Inaktivierung ("hitzestabiler" Inhibitor). Die Kurve c zeigt deutlich, daß nach Erhitzen des bereits inaktivierten Normalserums für 5 min auf 63°C die Inhibition durch den "hitzestabilen" Inhibitor erheblich zunimmt und die des hitzelabilen Inhibitors (zumindest bei niedrigen Referenzserumverdünnungen) sogar noch übertraf. Dieser Versuch bestätigt die Bedeutung des Aggregationszustandes für den Effekt des sog. hitzestabilen Inhibitors.

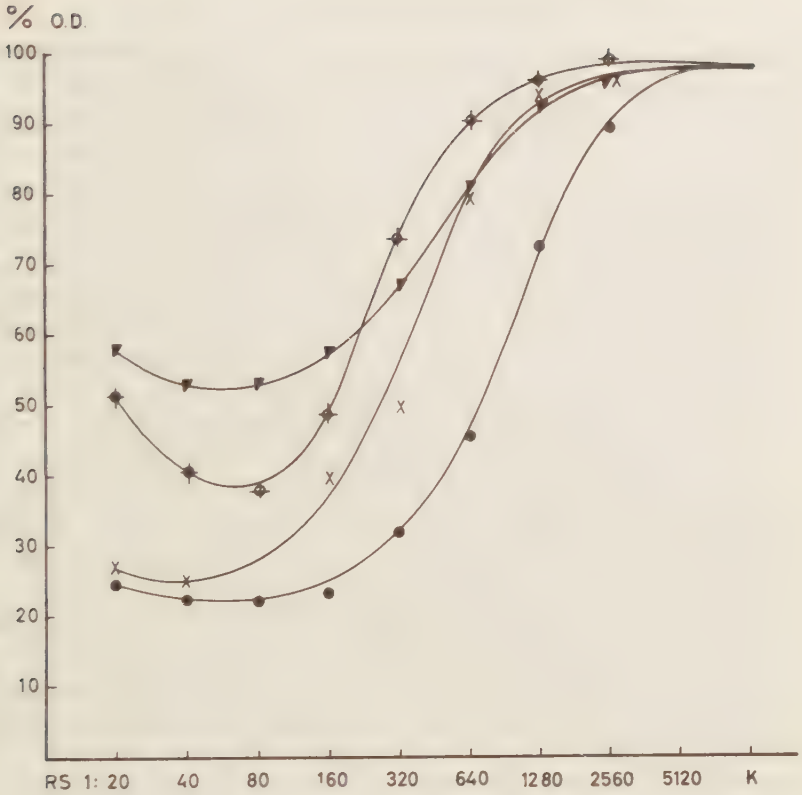


Abbildung 41

- = Versuch 10a
- × = Versuch 10b
- ▼ = Versuch 10c
- ◆ = Versuch 10d

Vergleich der Beeinflussung der durch Zugabe von Rheumatikerserum zu einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln erhaltenen Agglutinationskurve durch natives, inaktiviertes (30' 56°) bzw. weiter erhitztes (5' 63°) Normalserum.

D i s k u s s i o n

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Rheumafaktor bei einer Erhitzungsdauer von 10 Minuten bis zu einer Temperatur von 66°C hitzestabil ist. Entsprechende Angaben von M e y e r ⁸⁷ besagen, daß der Faktor bei 70°C (30 min) inaktiviert ist. Nach W a a l e r ¹⁴⁵ besteht bei Erhitzungsdauer von 30 Minuten Hitzestabilität bei einer Temperatur von 60°C . Die mit γ -Globulin beladenen Latexpartikel behalten bis zu einer Temperatur von 72°C bei ebenfalls 10minütiger Erhitzung ihre volle Reaktionsfähigkeit mit Rheumafaktor. Untersuchungen über die interessante Frage der Hitzestabilität der Bindung von Rheumafaktor mit den γ -Globulin-beladenen Latexpartikeln konnten bisher in der Literatur nicht aufgefunden werden. Nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen ist diese Bindung bis 59°C (bei 10-12minütiger Erhitzung) stabil. Bei Temperaturen von $60^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$ dissoziiert der Komplex reversibel. Diese Feststellungen nutzten wir zur Entwicklung einer Methode, um den Rheumafaktor zu isolieren. Er läßt sich im genannten Temperaturbereich von den beladenen Latexpartikeln absprengen und nach Zentrifugation vom beladenen Latexmaterial trennen. Da der Komplex zwischen Rheumafaktor und auf der Latexoberfläche aggregiertem 7S- γ -Globulin bei diesem Vorgehen reversibel dissoziiert ist, muß der gesamte Isolierungsvorgang, den wir eingehend beschrieben haben, in diesem Temperaturbereich vorgenommen werden. Vor allem ist die nach Zentrifugation der Latexpartikel überstehende, den Rheumafaktor enthaltende Pufferlösung in diesem Temperaturbereich abzuheben. Erst nach erfolgter Trennung kann der Rheumafaktor abgekühlt und eingefroren werden. Er bleibt dann wie Rheumafaktor im Rheumatikerserum im Latexagglutinationstest reaktionsfähig. Die Ausbeute an isoliertem Rheumafaktor ist bei verschiedenen Isolierungsvorgängen etwas unterschiedlich, es kann jedoch im Allgemeinen der Rheumafaktor mit nur geringem Titerverlust gegenüber dem Gehalt in der Serumausgangsmenge gewonnen werden. Durch Dialysiervorgänge kann die Rheumafaktorklösung weitgehend von den Puffersubstanzen befreit und bis auf das 120fache eingeeengt werden. Eine Gewinnung des Proteins in Substanz erscheint vorläufig wegen der hierzu benötigten Serum- und Materialmengen schwierig. Dagegen ist die gewonnene Menge für immunologische Determinierungsuntersuchungen vollkommen ausreichend.

Der isolierte Rheumafaktor hatte starke Antigeneigenschaften, da es gelang, mit Rheumafaktorklösung in einer Konzentration, die einer Serumverdünnung von 1:20 entsprach, durch Immunisierung von Kaninchen ein speziell gegen Rheumafaktor gerichtetes Antiserum zu gewinnen, wodurch weitere umfangreiche immunologische Untersuchungen bezüglich der Antigen determinanz ermöglicht wurden.

Hinsichtlich der Lokalisation des Rheumafaktors in bestimmten Serumfraktionen kamen wir durch unsere Untersuchungen zu keinen wesentlich neuen Erkenntnissen. Mit drei verschiedenen Serumfraktionierungsmethoden (Salzsäurefällung nach *V a u g h n* und Mitarbeiter ¹⁴³, Ammoniumsulfatfällung nach *W o l f s o n* und Mitarbeiter ¹⁵⁰ sowie Kältepräzipitation nach *S v a r t z* und *S c h l o s s m a n n* ¹³⁶) konnte im Latextropfentest keine Erhöhung der Trefferquote oder Erniedrigung der Quote falsch positiver Ergebnisse erzielt werden. Im Falle des Kältepräzipitates wurden auch dessen Überstand untersucht und Titerbestimmungen durchgeführt, wodurch eine Aussage bezüglich der Lokalisation des Rheumafaktors ermöglicht wurde. Wir kamen zu den gleichen Ergebnissen wie *M i c h e l i* und Mitarbeiter ⁸⁸, die die Feststellungen von *S v a r t z* und *S c h l o s s m a n n* ^{137, 136} nicht bestätigen konnten, daß sich der Rheumafaktor vorwiegend im Kältepräzipitat und weniger im Überstand befinden soll. Wir fanden wie *M i c h e l i* im Allgemeinen höhere Titer im Überstand. Auch war uns eine Trennung der bei Lebererkrankungen auftretenden Anti- γ -Globulin-Faktoren vom Rheumafaktor durch die Kältepräzipitation des Serums nicht möglich, wie *S v a r t z* und *S c h l o s s m a n n* ^{137, 136} im Gegensatz zu *M i c h e l i* und Mitarbeitern ⁸⁸ zumindest für die Anti- γ -Globulin-Faktoren beim Lupus erythematodes disseminatus beschrieben. Wir stellten als konstanten Befund lediglich fest, daß in den Fällen, die im Vollserum einen negativen, bei der Kältepräzipitation jedoch einen positiven Ausfall der Agglutinationsreaktion zeigten, nur mit dem Präzipitat, nicht dagegen mit dem Überstand eine (meist schwache) Agglutination erzielt wurde. Insofern mag das Kältepräzipitat als empfindlicher angesehen werden, jedoch zeigt sich dieses Verhalten auch bei sog. falsch positiven Ausfällen bei Gesunden und anderen Erkrankungen sowie insbesondere auch bei Lebererkrankungen. Eine erhöhte Trefferzahl war in unseren Untersuchungen also nicht zu er-

reichen. Möglich erscheint eine höhere Empfindlichkeit bei Anwendung einer "Euglobulin"-Fraktion im Agglutinationstest, die Z i f f und Mitarbeiter ¹⁵³ einer Trennung inhibitorischer Substanzen zuschrieben, eine Frage, auf die später noch näher einzugehen ist. Unsere Befunde bestätigen zumindest die Ansicht von M i c h e l i und Mitarbeitern ⁸⁸, daß Serumfraktionierungen bisher üblicher Art (meist wohl nicht ganz exakt als "Euglobulin"-Fraktionierungen bezeichnet) nicht geeignet sind, um Aussagen über die Lokalisation des Rheumafaktors im Serum-Proteinspektrum machen zu können.

Im Zusammenhang mit den bisher vorliegenden Befunden bezüglich der Natur des Rheumafaktors, die durch elektrophoretische, immunologische und ultrazentrifugale Untersuchungen gewonnen wurden, erlaubten unsere immunologischen Untersuchungen mit isoliertem Rheumafaktor und Anti-Rheumafaktor-Serum weitere Aussagen über die Natur des Rheumafaktors auf Grund seines immunologischen Verhaltens.

Bei unseren immunologischen Untersuchungen der isolierten Rheumafaktoren, der Anti-Rheumafaktor-Seren sowie der Rheumatiker-Vollseren der gleichen Patienten, aus deren Seren Rheumafaktor isoliert wurde, fanden sich gewisse Unterschiede im Auftreten charakteristischer Linien, der Diffusionsgeschwindigkeit der Antigene sowie der Identität der Linien untereinander. Die Befunde wurden in den betreffenden Versuchsreihen eingehend dargestellt. Bis auf den Fall P, dessen Rheumafaktor keinen Gehalt an β_2 -Makroglobulin zeigte, wurde in allen isolierten Rheumafaktoren bzw. Rheumatikervollseren eine Linie mit β_2 -Makroglobulin-Charakter gegen Anti-Human-Vollserum bzw. gegen Anti-Rheumafaktor-Serum gefunden. Ebenso zeigten die zwei Anti-Rheumafaktor-Seren einen Gehalt an Anti- β_2 -Makroglobulin durch Auftreten entsprechend determinierter Präzipitationslinien. Damit zeigte sich, daß es sich in Übereinstimmung mit der bisherigen Auffassung beim Rheumafaktor um ein β_2 -Makroglobulin handelt, das im übrigen gegenüber normalem β_2 -Makroglobulin keine Antigenspezifität aufweist. Die außerdem auftretenden Linien von 7S- γ -Globulin-Charakter, die meist mit Cohn-Fraktion II Identität zeigte, weist darauf hin, daß angelagertes 7S- γ -Globulin, also der 22S-Komplex mit den beladenen Latexpartikeln reagierte. Möglicherweise kann dieser Komplex nach Absprengung als Einheit oder auch in dissoziierter Form vor-

liegen, was nicht überrascht, da der 22S-Komplex ohnehin leicht dissoziierbar ist und auch im Rheumatikerserum die 7S- γ -Globulin-Moleküle nicht irreversibel an den 19S-Molekülen haften⁹⁷. Unsere Anhaltspunkte für das unterschiedliche Verhalten (vorhandene Komplexbildung oder das dissoziierte Vorliegen beider Komponenten) ist die einmal vorhandene und einmal fehlende Antigenidentität der β_2 -Makroglobuline und 7S- γ -Globuline. Daneben fand sich noch ein Fall einer Kreuzreaktion als Ausdruck einer Teilidentität.

Schließlich haben wir in drei Fällen das Vorhandensein eines rheumafaktor-aktiven 7S-Globulins zu diskutieren. Bei der Auswahl unserer Patientenserum hinsichtlich ihres hohen Titers würde die Häufigkeit eines 7S-Rheumafaktors nicht überraschen, zumal immunologische Methoden anscheinend eine größere Empfindlichkeit aufweisen als die Ultrazentrifuge. Anhaltspunkte für das Vorliegen eines 7S-Rheumafaktors waren das Auftreten zweier γ -Globulinlinien im Anti-Rheumafaktor-Serum in der Immunelektrophorese sowie nicht identische (auch nicht teilidentische) Linien von Rheumafaktor mit 7S- γ -Globulin- bzw. CF II-Charakter, die sonst untereinander Identität oder zumindest Teilidentität zeigten.

In einem Fall eines aus hochtitrigem Rheumatikerserum isolierten Rheumafaktors war kein β_2 -Makroglobulin nachzuweisen. Auch zeigte das Vollserum dieses Patienten gegen Anti-Rheumafaktor-Serum, das sonst einen Anti- β_{2M} -Globulin-Gehalt zeigte, eine sehr schwache Linie im β_{2M} -Globulin-Bereich. Es ist also möglich, daß dieses Serum keinen 19S-Rheumafaktor, wegen der deutlichen Linie im 7S- γ -Globulin-Bereich jedoch einen 7S-Rheumafaktor aufweist. In den anderen Fällen, in denen wir das Vorhandensein eines 7S-Rheumafaktors diskutierten, besteht daneben jedoch sicher ein 19S-Rheumafaktor. Diese Seren würden dann den von T o m a s i (zit.⁶⁷) beschriebenen Fällen entsprechen.

Diese Ergebnisse unserer immunologischen Untersuchungen geben Hinweise auf näher zu klärende Fragestellungen hinsichtlich einer unterschiedlichen Struktur bzw. unterschiedlicher Komponenten der Rheumafaktoren einzelner Patienten, die auch mit der Ultrazentrifuge sicher nicht in vollem Umfang zu beantworten sind. Es waren bisher immunologische Untersuchungen mit Rheumatikerserum und besonders mit isolierten Rheumafaktoren und Anti-Rheumafaktor-Seren nicht in größerem

Umfang durchgeführt worden, so daß Vergleichsmöglichkeiten mit unseren Ergebnissen noch nicht gegeben sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß eine Rheumafaktor-Aktivität, wie bisher angenommen, im β_{2M} (19S)-Globulin- oder 7S- γ -Globulin-Bereich oder auch in beiden Bereichen lokalisiert sein kann und daß Komplexbildungen mit nicht aktivem 7S- γ -Globulin vorhanden sind, die im isolierten Rheumafaktor anscheinend dissoziiert oder als Komplex vorliegen können.

Im übrigen haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß eine Parallelität zwischen Rheumafaktoraktivität und β_2 -Makroglobulin-Vermehrung im Rheumatikerserum nicht besteht. Der Rheumafaktor bestimmt also nicht allein das Ausmaß der β_2 -Makroglobuline im Rheumatikerserum. Bei der Antigenidentität zwischen dem β_2 -Makroglobulin des Rheumafaktors und normalem β_2 -Makroglobulin muß das Auftreten des Rheumafaktors nicht unbedingt die Bildung neuen β_2 -Makroglobulins bedeuten, sondern es kann vielleicht lediglich seinen Charakter in bestimmter Weise verändern, wodurch es zur Reaktion mit anderen γ -Globulinen befähigt wird. Andererseits ist natürlich die Bildung von Autoantikörpern im β_2 -Makroglobulin- (oder auch 7S- γ -Globulin) Bereich mit Rheumafaktoraktivität neben einer allgemeinen Proteinvermehrung in den genannten Fraktionen möglich.

Die genauere Aufklärung der Wirkung der Inhibitoren erlaubt eine Diskussion auch über die Reaktionsweise des Rheumafaktors und ist deshalb in diesem Zusammenhang wesentlich. In Ergänzung bisher vorliegender Befunde zeigen unsere Untersuchungsbefunde zunächst, daß ein hitzelabiler Inhibitor existiert, der die Reaktion des Rheumafaktors mit γ -Globulin-beladenen Latexpartikeln hemmt. Dieser Inhibitor ist sowohl im Normalserum, bei dessen Zugabe zum Agglutinationssystem die Agglutination abgeschwächt wird, als auch im Rheumatikerserum selbst vorhanden, wie das Prozononphänomen im Agglutinationstest mit nativem Rheumatikerserum zeigt. Dieser hitzelabile Inhibitor verliert durch Inaktivierung für 30 min bei 56°C seine Wirksamkeit. Er reagiert im Agglutinationssystem eindeutig sowohl mit den beladenen Latexpartikeln als auch mit Rheumafaktor und besetzt somit wahrscheinlich an beiden Reaktionsteilnehmern Stellen, die eine gegenseitige Reaktion zwischen Rheumafaktor und aggregier-

tem γ -Globulin verhindern. B e r n h a r d und Mitarbeiter ⁹ hatten bisher eine Reaktion nur mit aggregiertem γ -Globulin, D e i c h e r ²¹ dagegen eine bevorzugte Anlagerung an den Rheumafaktor angenommen.

Nach Reaktion des hitzelabilen Inhibitors mit den beladenen Latexpartikeln oder mit Rheumafaktor läßt er sich nicht mehr inaktivieren. Bei elektrophoretischer Serumauftrennung lokalisierte D e i c h e r ²¹ diesen Inhibitor in den Bereich der α_2 -Globuline. S c h u b a r t ¹²¹ sah bereits Beziehungen zum Komplement und gewann durch isolierte Komplement-Komponenten-Untersuchungen Anhaltspunkte dafür, daß die C₁-Komponente des Komplements für die inhibitorische Aktivität entscheidend sei. Neben der Inaktivierbarkeit des Inhibitors bei 56°C sprach auch die Möglichkeit, den Inhibitor durch Antigen-Antikörper-Komplexe zu absorbieren ¹⁵², für die Komplementnatur dieses hitzelabilen Inhibitors. Sollte sich jedoch Komplement bzw. eine Komplement-Komponente an aggregiertes γ -Globulin oder auch an den Rheumafaktor anlagern können und damit die Rheumafaktor- γ -Globulin-Komplexbildung verhindern, so müßte angenommen werden, daß das freie Ende des Komplements in beiden Fällen nicht zur Bindung fähig ist. Dagegen müßte der Rheumafaktor selbst ein freies Ende besitzen, daß so wie das eine Ende des Inhibitors eine Bindung mit γ -Globulin eingehen kann. Diese Überlegung läßt annehmen, daß auch der Rheumafaktor eine Komplementnatur aufweist, wie dies auch bereits diskutiert wurde ^{28, 93, 140}. Rheumafaktor wird wie Komplement an Immunpräzipitate und an bei Antigenüberschuß auftretende lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe absorbiert ^{140, 28}.

Ein Einwand gegen die Komplementnatur des Rheumafaktors war die Tatsache, daß er nicht durch Erhitzen auf 56°C inaktiviert werden kann. Auch bei Inaktivierung der einzelnen Komplement-Komponenten verliert der Rheumafaktor nicht seine Aktivität ⁷². Gegen diesen Einwand ist wiederum zu sagen, daß eine Inaktivierung nicht erwartet werden kann, wenn es sich um einen bereits bestehenden Komplex aus Rheumafaktor und Komplement handelt.

In diesem Zusammenhang sind die folgenden Befunde unserer hier vorgelegten Untersuchungen zu diskutieren. Einmal fanden wir in den immunologischen Untersuchungen mit Anti-Rheumafaktor-Seren eine Präzipitationslinie, die aller Wahrscheinlichkeit nach einen Anti-

β_{1A} -Globulin-Charakter aufweist. Da das Anti-Rheumafaktor-Serum mit dem Material gewonnen wurde, das sich bei der Agglutinationsreaktion an aggregiertes γ -Globulin angelagert hatte, erscheint eine β_{1A} -Globulin-Komponente des absorbierten Materials zwar nicht bewiesen, aber doch möglich. In Übereinstimmung mit diesem Befund steht unsere Beobachtung, daß unsere Rheumatikerseren gegenüber Normalseren anscheinend auffallend häufig eine β_{1A} -Globulin-Linie in der Immunelektrophorese zeigten, und zwar bereits in Seren, die sofort nach der Blutabnahme verarbeitet wurden, also noch keinem wesentlichen Alterungsprozeß ausgesetzt waren. Beim β_{1A} -Globulin, das normalerweise in frischen Seren nicht bzw. gegenüber den Rheumatikerseren in geringerem Ausmaß vorhanden ist, soll es sich nach Müller-Eberhard und Mitarbeitern^{101, 102} um eine Umwandlung der C'_3 -Komponente handeln, die normalerweise immunelektrophoretisch als β_{1C} -Globulin-Linie erscheint und sich bei Alterung der Seren bzw. Komplementverbrauch in β_{1A} -Globulin umwandelt. Während das β_{1C} -Globulin eine Sedimentationskonstante von 9,5S aufweist, hat β_{1A} -Globulin eine solche von 6,9S. Es ist also zu diskutieren, ob der Rheumafaktor die C'_3 -Komponente als β_{1A} -Globulin angelagert enthält, die ihn zur Bindung an aggregiertes γ -Globulin befähigt. Dieser Vorstellung käme die Auffassung Heimer's (zit.⁶⁷) entgegen, daß sich der Rheumafaktor wie der inaktive Teil eines Komplements verhält, da γ -Globulin-beladene Latexpartikel nur Komplement binden können, wenn kein Rheumafaktor zugegen ist. Es "wetteifern" also Komplement und Rheumafaktor um den selben Platz am 7S- γ -Globulin (Heimer, zit.⁶⁷). Einen Verbrauch an aktivem Komplement bei chronischer Polyarthritits beschrieben im Gegensatz zu anderen Autoren^{29, 72} übrigens Perlick¹¹⁰ sowie Geidel und Mitarbeiter⁴⁰.

Unsere vorläufig hypothetische Vorstellung geht also dahin, daß Rheumafaktor vielleicht mittels der C'_3 -Komponente des Komplements mit aggregiertem γ -Globulin reagiert, während bei Besetzung der gleichen Stellen am γ -Globulin mit aktivem Komplement keine passenden Stellen zur Komplexbildung zur Verfügung stehen. Wir werden diesen Fragen in späteren Untersuchungen noch näher nachzugehen haben.

Wir haben auf Grund unserer oben eingehend geschilderten Befunde Anhaltspunkte dafür, daß der sog. hitzestabile Inhibitor erst durch Aggregation von 7S- γ -Globulin durch Erhitzung der Seren entsteht.

Falls in nicht inaktivierten Seren hitzestabiler Inhibitor gefunden wird, soll er auch bereits Aggregate darstellen ²¹, die möglicherweise durch die Aufbereitung der Seren (z.B. elektrophoretische Auftrennung) entstehen und im nativen Vollserum wohl kaum bzw. in sehr geringer Menge vorhanden sind. Jedenfalls nimmt die inhibitorische Aktivität der Serumfraktion, die hitzestabilen Inhibitor vor Inaktivierung enthielt, erheblich zu, wenn man die Seren inaktiviert ²¹.

Wir haben durch die von uns gewählten Versuchsanordnungen zeigen können, daß die inhibitorische Potenz der nativen Normalseren deutlich gesteigert wird, wenn man den hitzelabilen Inhibitor durch Bindung an aggregiertes γ -Globulin hitzestabilisiert und erst dann die Seren 30 min auf 56°C erhitzt. Die Zunahme der Inhibitionswirkung erfolgt dabei etwa um den Betrag, den die Inhibition durch inaktiviertes Normalserum (ohne vorherige Stabilisierung des hitzelabilen Inhibitors) ausmacht. Wir kommen damit zu der Auffassung, daß ein echter "hitzestabiler" Inhibitor nicht vorhanden ist, sondern erst durch Aggregation von 7S- γ -Globulin-Molekülen entsteht. Insofern wirkt der "hitzestabile" Inhibitor wie Reaktant und abstrahiert Rheumafaktor von der Anlagerung an die beladenen Latexpartikel. Die Inaktivierung der Seren durch Erhitzen für 30 Minuten auf 56°C genügt bereits zur Bildung von Aggregaten, wie das auch bereits C h r i s t i a n ¹⁵ annahm. Durch weitere Erhitzung für 5 Minuten auf 63°C konnten wir die Aggregatbildung und damit die inhibitorische Potenz der Seren noch weiter steigern.

Wir glauben auch mit C h r i s t i a n ¹⁵ sowie F r a n k l i n und Mitarbeiter ³⁸, daß im Ziff'schen Inhibitionstest die verwendete, aus inaktiviertem Serum gewonnene Euglobulinfraktion einen Aggregationszustand der 7S- γ -Globuline aufweist, wodurch Rheumafaktor im zu untersuchenden Serum mit diesen Aggregaten reagiert. Dadurch kann der "hitzestabile" Inhibitor (γ -Globulin-Aggregate) nicht mehr inhibitorisch auf das Referenzserum einwirken. Somit lassen sich dann indirekt geringe Rheumafaktormengen in Seren nachweisen, die noch keine positive Reaktion im direkten Agglutinationstest ergeben.

Es bleibt die Wirkung eines Serumfaktors zu erklären, der anscheinend die bereits abgelaufene Reaktion zwischen Rheumafaktor und

beladenen Latexpartikeln inhibiert. Diese Inhibition ist bei der von uns verwendeten Normalserumverdünnung von 1:10 sehr gering bzw. wohl kaum signifikant, kommt jedoch bei einer Verdünnung von 1:5 deutlicher zum Ausdruck. Die bisher beschriebenen hitzelablen bzw. hitzestabilen Inhibitoren dürften für dieses Phänomen nicht verantwortlich zu machen sein. Es wird sich hier vielleicht um die von C h r i s t i a n ¹⁵ beschriebene inhibitorische Fähigkeit nicht-aggregierten γ -Globulins handeln, das nach E p s t e i n (zit. ¹⁵) bei großem Überschuß in der Lage ist, bereits gebildete Präzipitate wieder zu lösen. C h r i s t i a n ¹⁵ hat gezeigt, daß die Wirkung dieses Inhibitors vor allem vom Reaktionsvolumen und vom Grad der Verdünnungen der Reaktionsteilnehmer abhängig ist, da nur in relativem Überschuß vorhandenes unaggregiertes γ -Globulin eine hemmende Wirkung auf die Präzipitations-Reaktion ausübt. Dafür spricht auch unser Befund, daß die Hemmung auf die bereits abgelaufene Reaktion nur bei höheren Rheumatikerserum-Verdünnungen deutlich wird.

Hinsichtlich der Natur und Wirkungsweise der Inhibitoren läßt sich zusammenfassend sagen, daß ein hitzelabiler Inhibitor, vermutlich mit Komplementeigenschaften besteht, der sowohl mit aggregiertem 7S- γ -Globulin als auch mit Rheumafaktor reagiert und damit die Reaktion zwischen Rheumafaktor und 7S- γ -Globulin-Aggregaten hemmt. Der sog. "hitzestabile" Inhibitor, der mit Rheumafaktor reagiert, dürfte aggregiertes 7S- γ -Globulin sein, das vorwiegend erst durch Inaktivierung des Serums entsteht und sich somit wie Reaktant verhält, wodurch es Anteile des Rheumafaktors von seiner Reaktion mit beladenen Latexpartikeln abstrahiert. Schließlich ist unaggregiertes γ -Globulin als Inhibitor zu diskutieren, der im Überschuß vermutlich auch die bereits abgelaufene Reaktion zwischen Rheumafaktor und beladenen Latexpartikeln lösend beeinflusst.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde durch eigene Untersuchungen festgestellt, daß der Rheumafaktor bei 10-minütigem Erhitzen bis zu 66°C hitzestabil ist und daß die mit γ -Globulin beladenen Latexpartikel bis zu 72°C ihre Reaktionsfähigkeit mit Rheumafaktor behalten. Weiter wurde gefunden, daß der durch Reaktion von Rheumafaktor mit an der Latexoberfläche aggregiertem γ -Globulin gebildete Komplex bis zu 59°C stabil ist, aber im Temperaturbereich von $60^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$ reversibel dissoziiert. Das bedeutet, daß bei diesen Temperaturen der aus Rheumatikerserum an beladene Latexpartikel gebundene Rheumafaktor wieder abgesprengt werden kann, jedoch bei Abkühlung wiederum die Komplexbildung eingeht. Auf Grund dieses Befundes wurde eine Isolierungsmethode des Rheumafaktors entwickelt und erstmals beschrieben. Bei Erhitzen der Suspension beladener Latexpartikel nach Reaktion mit Rheumafaktor wird der Rheumafaktor wieder abgesprengt und erscheint nach Zentrifugation der Latexpartikel im Überstand, der noch in der Wärme ($60^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$) abgehoben werden muß. Der Rheumafaktor kann durch Dialyse weitgehend eingeengt werden. Durch Immunisierung von Kaninchen mit isoliertem Rheumafaktor konnten Anti-Rheumafaktor-Seren gewonnen werden.

Eine nähere Lokalisation des Rheumafaktors im Proteinspektrum war durch Serumfraktionierungsmethoden (Salzsäure- bzw. Ammoniumsulfatfällung, Haltepräzipitation) nicht möglich. Auch ließ sich dadurch keine günstigere Treffer- und Fehlerquote im Latexagglutinationstest erreichen.

Mit Rheumatikerseren, isolierten Rheumafaktoren und Anti-Rheumafaktor-Seren wurden umfangreiche Untersuchungen mit der Immunelektrophorese und der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony durchgeführt, um nähere Einblicke in die Natur der Rheumafaktoren und ihre Lokalisation im Proteinspektrum zu erhalten. Die erzielten Präzipitationslinien wurden durch spezifische Antiseren zu determinieren versucht. Es zeigte sich, daß die von uns isolierten Rheumafaktoren unterschiedliche Strukturen aufwiesen, wie dieses nach bisherigen Untersuchungen vorwiegend mit der Ultrazentrifuge bereits anzunehmen war. Bis auf den Rheumafaktor eines Patienten wiesen alle isolierten Rheumafaktoren einen β_2 -Makroglobulin-Charakter auf ohne Antigenspezifität gegenüber normalem β_2 -Makroglobulin. Daneben fand sich ein Gehalt

des Rheumafaktors an $7S-\gamma$ -Globulin, das als teils angelagertes Globulin (im Sinne eines $22C$ -Komplexes) teils aber auch als rheumafaktor-aktives $7S-\gamma$ -Globulin (im Sinne eines sog. Intermediär-Komplexes) diskutiert wurde. Der Rheumafaktor ohne Gehalt an β_2 -Makroglobulin zeigte allein $7S-\gamma$ -Globulin-Charakter. Schließlich fand sich im Anti-Rheumafaktor-Serum ein Gehalt an vermutlichem Anti- β_{1A} -Globulin, was darauf hindeutet, daß ein Globulin des β_{1A-C} -Komplexes mit an beladene Latexpartikel gebunden und beim Isolierungsvorgang wieder abgesprengt wird. Vielleicht handelt es sich hier um die C'_3 -Komponente des Komplements, deren etwaige Bedeutung bei der Reaktion des Rheumafaktors mit aggregiertem γ -Globulin diskutiert wird.

Untersuchungen mit geeigneten Versuchsanordnungen über die hemmenden Eigenschaften von Normalseren auf die latexagglutinierende Wirkung des Rheumafaktors ergaben, daß ein hitzelabiler Inhibitor existiert, der sowohl mit aggregiertem γ -Globulin als auch mit Rheumafaktor reagiert und die Reaktion von Rheumafaktor mit aggregiertem γ -Globulin verhindert.

Ein bisher als hitzestabil angesehener Inhibitor wurde durch unsere Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Auffassung einiger Autoren als erst bei der Inaktivierung der Seren durch Aggregation von $7S-\gamma$ -Globulin entstehend erkannt. Er wirkt im Agglutinationssystem wie Reaktant und abstrahiert Rheumafaktor von der Anlagerung an die beladenen Latexpartikel.

Schließlich wird unaggregiertes γ -Globulin als Inhibitor diskutiert, das bei großem Überschuß in der Lage ist, auch gebildete Präzipitate wieder zu lösen. Es kann vermutlich demnach auch die bereits abgelaufene Reaktion zwischen Rheumafaktor und beladenen Latexpartikeln lösend beeinflussen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Abrams, A., Cohen, P. P. and Meyer, O. O.: J. Biol. Chem. 181, 237 (1949); zit.: Svartz, N. u. Schlossmann, K.: (136)
- 2) Adler, F. L.: Antibody formation after injection of heterologous immune globulin. J. Immunol. 76, 217 (1956)
- 3) Antonaci, B. L., Ravaioli, P., Braconi, M., del Giovane, L. e Ravenni, G.: Localizzazione del fattore reumatoide nelle sieroproteine e sua composizione in aminoacidi. Reumatismo 11, 346 (1959)
- 4) Armstrong, S. H., Budka, M. J. E. and Morrison, K. C.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XI. Quantitative interpretation of electrophoretic Schlieren diagrams of normal human plasma proteins. J. Amer. chem. Soc. 69, 416 (1947)
- 5) Ball, J. and Lawrence, J. S.: Epidemiology of the sheep cell agglutination test. Ann. rheum. Dis. 20, 235 (1961)
- 6) Bartfeld, H.: Immunologic and biologic similarities of seropositive rheumatoid and nonrheumatoid disease sera: Gel diffusion studies. J. Lab. clin. Med. 56, 303 (1960)
- 7) Behrend, T.: Epidemiologische Untersuchungen über chronisch-entzündliche Rheumatismusfolgen in der Bevölkerung und in Arthritiker-Familien. Z. Rheumaforsch. 22, 379 (1963)
- 8) Behrend, T. u. Cleve, H.: Immuno-elektrophoretische Untersuchungen von Ultrazentrifugenpräparationen bei primär chronischer Polyarthrit. Z. Rheumaforsch. 19, 121, 217 (1960)
- 9) Bernhard, G. C., Cheng, W. and Talmage, D. W.: The Reaction of Rheumatoid Factor and Complement with γ -Globulin coated Latex. J. Immunol. 88, 750 (1962)
- 10) Black, A., Goldin, M., Poske, R. M. and Malmel, L.: Differentiation between rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus by sheep-cell agglutination tests. Arthritis Rheumatism 2, 99 (1959)
- 11) Bozicevich, J., Bunim, J. J., Freund, J. and Ward, S.B.: Bentonite flocculation test for rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. 97, 180 (1958)
- 12) Burby, G. and Behr, G.: The latex fixation test in rheumatoid arthritis. Lancet 1958/I, 1157
- 13) Burnet, F. M.: The clonal selection theory of acquired immunity. University press, Cambridge 1959
- 14) Cecil, R. L., Nicholls, E. E. and Stainsby, W. J.: The etiology of rheumatoid arthritis. Amer. J. med. Sci. 181, 12 (1931)
- 15) Christian, C. L.: Characterisation of the "reactant" (gamma globulin factor) in the F II precipitin reaction and the F II tanned sheep cell agglutination test. J. exp. Med. 108, 139 (1958)
- 16) Cleve, H.: Neuere immuno-elektrophoretische Untersuchungen im Serum Rheumakranker. Z. Rheumaforsch. 17, 350 (1958)
- 17) Cleve, H. u. Hartmann, F.: Immuno-elektrophoretische Untersuchungen im Serum Rheumakranker. Klin. Wschr. 35, 334 (1957)

- 18) Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M. a. Taylor, H. L.: J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946); zit. Grabar, P. et Burtin, P.: (44)
- 19) Comoli, G. et Allegra, G.C.: Sur quelques aspects du tracé immuno-électrophorétique du sérum dans l' arthrite rhumatismale. Schweiz. med. Wschr. 92, 1349 (1962)
- 20) Dawson, M. H., Olmstead, M. a. Boots, R. H.: Agglutination reaction with streptococcus hemolyticus. J. Immunol. 23, 187 (1932)
- 21) Deicher, H.: Mechanismus und Anwendung des Latex-Hemmungstests zur Diagnostik der primär-chronischen Polyarthrititis. I. Mitteilung. Klin. Wschr. 39, 612 (1961)
- 22) Deicher, H. u. Behrend, T.: Das γ -Globulin "Antigen" des Latex-Fixations-Tests. Z. Rheumaforsch. 20, 119 (1961)
- 23) Deicher, H., Kirchberg, G., Behrend, T. u. Fricke, R.: Mechanismus und Anwendung des Latex-Hemmungstests zur Diagnostik der primär-chronischen Polyarthrititis. II. Mitteilung. Klin. Wschr. 40, 167 (1962)
- 24) Deicher, H. u. Schupp, E.: Frequenzen von Gm-Serum-Gruppen bei der primär-chronischen Polyarthrititis. Z. Rheumaforsch. 22, 69 (1963)
- 25) Deutsch, H. F., Alberty, R. A. and Gosting, L. J.: Biophysical studies of blood plasma proteins, I. Separation and purification of a new globulin from normal human plasma. J. biol. Chem. 165, 21 (1946)
- 26) Diekmanns, H. u. Fritze, E.: Das Caplansyndrom (Arthritis bei Silikose) Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 65, 411 (1959)
- 27) Dresner, E. a. Trombly, P.: The latex-fixation reaction in nonrheumatic Diseases. New Engl. J. Med. 261, 981 (1959)
- 28) Edelmann, G. M., Kunkel, H. G. and Franklin, E. C.: Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gammaglobulin. J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 29) Ellis, H. A. and Felix-Davies, D.: Serum complement, rheumatoid factor and other serum proteins in rheumatoid disease and systemic lupus erythematosus. Ann. rheum. Dis. 18, 215 (1959)
- 30) Epstein, W., Johnson, A. and Ragan, C.: Observations on a precipitin reaction between serum of patients with rheumatoid arthritis and a preparation (Cohn fraction 11) of human gamma globulin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 235 (1956)
- 31) Eyquem, A., Guyot-Jeannin, N. et Podliachouk, L.: Présence dans lex immunserums anti-bactériens de facteurs anti-globulinique analogues a ceux de la polyarthrite chronique évolutive. Ann. Inst. Pasteur 96, 295 (1959)
- 32) Fallet, G. H., Meyer, E. et Scheidegger, J. J.: La réaction de fixation au Latex (F II LP) dans les affections rhumatismales et non rhumatismales. Ev. Rhum. 28, 159 (1961)
- 33) Francq, J. E., Eyquem, A. et Grabar, P.: L'analyse immuno-electrophorétique en fluorescence. Rev. franç. Et. clin. biol. 4, 821 (1959)
- 34) Francq, J. C., Eyquem, A., Podliachouk, L. et Jacqueline, F.: Étude immuno-electrophorétique des rhumatismes inflammatoires chroniques. Ann. Inst. Pasteur 96, 413 (1959)

- 35) Franklin, E. C.: Precipitation reaction between rheumatoid factors and gamma globulin. *Arthritis Rheumatism* 3, 16 (1960)
- 36) Franklin, E. C.: The interactions of rheumatoid factors and gamma globulins. *Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo*, Rom 3.-7.9.1961
- 37) Franklin, E. C., Fudenberg, H., Meltzer, M. and Stanworth, D. R.: The structural basis for genetic variations of normal human gamma globulins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 914 (1962)
- 38) Franklin, E. C., Holman, H. R., Müller-Eberhard, H. J. and Kunkel, H. G.: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. exp. Med.* 105, 425 (1957)
- 39) Franklin, E. C., Kunkel, H. G., Müller-Eberhard, H. J. and Holman, H. R.: Relation of high molecular weight proteins to the serological reactions in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* 16, 315 (1957)
- 40) Geidel, H., Selle, K. u. Schabinski, G.: Untersuchungen über den differentialdiagnostischen Wert der Komplementbestimmung bei rheumatischen und pararheumatischen Erkrankungen. *Z. ges. inn. Med.* 19, 68 (1964)
- 41) Germer, W. D., Göbel, P. u. Missmahl, H. P.: Modellversuch zum chronisch-rheumatischen Geschehen. *Verh. dtsh. Ges. Inn. Med.* 64, 349 (1958)
- 42) Gibson, H. J. and Ling, N. R.: Modified Waaler-Rose-Reaction employing sensitized human cells. *Ann. Rheum. Dis.* 15, 246 (1956)
- 43) Grabar, P.: Die Rolle der Bluteiweißkörper bei der humoralen Abwehr. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 66, 279 (1960)
- 44) Grabar, P. et Burtin, P.: Analyse immuno-électrophorétique, Masson & Cie., Paris 1960
- 45) Grabar, P. et Williams, C. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétique et immunochimique d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. *Biochim. biophys. Acta* 10, 193 (1953)
- 46) Grubb, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. *Acta path. microbiol. Scand.* 39, 195 (1956)
- 47) Grubb, R.: Reaction of rheumatoid arthritis sera with a human antibody gamma globulin. *Acta rheum. Scand.* 3, 55 (1957)
- 48) Grubb, R.: Interactions between rheumatoid arthritis sera and human gamma globulin. *Acta haemat.* 20, 246 (1958)
- 49) Grubb, R.: The relationship between the Gm serum groups and the rheumatoid arthritis serum factor, in Grabar, P. u. Miescher, P.: *Immunopathologie, I. Internat. Symposium*, 359 (1958)
- 50) Grubb, R. and Laurell, A. B.: Hereditary serological human serum groups. *Acta path. microbiol. Scand.* 39, 390 (1956)
- 51) Gum, O. B. and Smith, C. J.: *Arthritis Rheumatism* 62, 2 (1959); zit.: Block, K. J.: Recent modifications in serological tests for rheumatoid arthritis. *Bull. rheum. Dis.* 9, 185 (1959)

- 52) Hall, A. P., Mednis, A. D. and Bayles, T. B.: Latex agglutination and inhibition reactions; clinical experience in diagnosis of rheumatoid arthritis. New England J. Med. 258, 731 (1958)
- 53) Harboe, M.: Heterogenity of the "rheumatoid factor". Atti del X. Congr. della lega internazionale contro il reumatismo, Rom 3.-7.9.1961
- 54) Harboe, M. and Lundevall, J.: A new type in the Gm system. Acta path. microbiol. Scand. 45, 357 (1959)
- 55) Harboe, M., Osterland, C. K. and Kunkel, H. G.: Localisation of two genetic factors to defferent areas of gamma globulin molecules. Science 136, 979 (1962)
- 56) Harter, F.: Der Latex-Test und die Agglutination mit sensibilisierten Schafserthrozyten im Kältepräzipitat im Rahmen der für die primär-chronische Polyarthritits charakteristischen Serumveränderungen. Z. Rheumaforsch. 18, 150 (1959)
- 57) Heimer, R., Schwartz, E. R. and Freyberg, R. H.: J. Lab. Clin. Invest. 57, 16 (1961); zit.: Deicher, H. u. Schupp, E.: (24)
- 58) Heller, G., Jacobson, A. S. and Kolodny, M. H.: A modification of the hemagglutination test for rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 316 (1949)
- 59) Heller, G., Jacobson, A. S., Kolodny, M. H. and Kammerer, W. H.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis, II. The influence of human plasma fraction II (gamma globulin) on the reaction. J. Immunol. 72, 66 (1954)
- 60) Heller, G., Jacobson, A. S., Kolodny, M. H. and Schuman, R. L.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis. I. An immunological analysis of the factors involved in the reaction. J. Immunol. 69, 27 (1952)
- 61) Heller, G., Kolodny, M. H., Lepow, I. H., Jacobson, A. S., Rivera, M. E. and Marks, G. H.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis. J. Immunol. 74, 340 (1955)
- 62) Heremans, J. F.: Les globulines sériques du système gamma, leur nature et leur pathologiques. Edition Arscia, Bruxelles-Paris 1960
- 63) Hobson, D. u. Gorill, R. H.: Agglutination test for rheumatoid arthritis. Lancet I, 389 (1952)
- 64) Howell, D. S., Malcolm, J. M. and Pike, R.: The F II agglutination factors in serum of patients with non-rheumatic diseases. Amer. J. Med. 29, 662 (1960)
- 65) Kleine, N., Müller, W. u. Matthes, M.: Ein neues Verfahren zum Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und Gammaglobulin. Z. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
- 66) Kunkel, H. G.: Immunologic aspects of rheumatoid arthritis. J. chron. Dis. 10, 418 (1959)
- 67) Kunkel, H. G.: The structure of rheumatoid factors, in: Immunologic aspects of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 6, 414 (1963)
- 68) Kunkel, H. G., Franklin, E. C. and Müller-Eberhard, H. J.: Studies on the isolation and characterization of the "rheumatoid factor". J. clin. Invest. 38, 424 (1959)

- 69) Kunkel, H. G. and Fudenberg, H. H.: Auto- and iso-specificity of rheumatoid factors for gamma globulin. Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo, Rom 3.-7.9.1961
- 70) Kunkel, H. G., Müller-Eberhard, H. J., Fudenberg, H. H. and Tomasi, T. B.: Gamma globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other conditions. J. clin. Invest. 40, 117 (1961)
- 71) Lamont-Havers, R. W.: Nature of serum factors causing agglutination of sensitized sheep cells and group A hemolytic streptococci. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 35 (1955)
- 72) Laurell, A. B. and Grubb, R.: Complement, complement components, properdin and agglutination promoting factors in rheumatoid arthritis. Acta path. microbiol. Scand. 43, 310 (1958)
- 73) Lawrence, J. S. and Ball, J.: Genetic studies on rheumatoid arthritis. Ann rheum. Dis. 17, 160 (1958)
- 74) Lerner, A. B. and Watson, C. J.: J. med. Sci. 214, 410 (1947); zit.: Svartz, N. u. Schlossmann, K.: (127)
- 75) Lerner, E. M., Williams, R. R. and Jenkins, J. C.: The sensitized sheep cell hemagglutination reaction in rats with an experimental infection of bone and joint. Proc. Soc. exp. Biol. 99, 249 (1958)
- 76) LoSpalluto, J. and Ziff, M.: Chromatographic studies on the rheumatoid factor. J. exp. Med. 110, 169 (1959)
- 77) Mackiewicz, S. and Fenrych, V.: Immuno-electrophoretic analysis of proteins in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Ann. rheum. Dis. 20, 265 (1961)
- 78) Mathies, H.: Der Rheumafaktor in der Rheumadiagnostik. Med. Klin. 55, 208 (1960), dort weitere Literaturangaben.
- 79) Mathies, H.: Treffer- und Fehlerquote des Latextropfentestes zum Nachweis des Rheumafaktors bei Verwendung verschiedener Serumfraktionen und Reagentien. VII. Internat. Kongr. Inn. Med. München, 5.-8. Sept. 1962
- 80) Mathies, H.: Neuere über den Rheumafaktor aus Forschung und Praxis. 62. Tagung nordwestdtsh. Ges. inn. Med. Hamburg, 31.1.-1.2.1964
- 81) Mathies, H.: unveröffentlichte Untersuchungen
- 82) Mathies, H. und Achatz, F.: Treffer- und Fehlerquote sowie Bewertung von Titerbestimmungen beim Latex-Tropfentest unter Verwendung verschiedener Reagentien, in Vorbereitung
- 83) Mathies, H. u. Fladerer, M.: Ergebnisse mit einer Modifikation des Inhibitionstests in Verbindung mit dem Latextropfentest zur serologischen Rheumadiagnostik. Dtsch. med. Wschr. 88, 2391 (1963)
- 84) Mathies, H. u. Färnrohr, S.: Die Treffer- und Fehlerquote des Latextropfentestes bei Verwendung von Vollserum, Euglobulinfraktion und Kältepräzipitat. Klin. Wschr. 40, 740 (1962)
- 85) Mathies, H. u. Kuntz, O.: unveröffentlichte Untersuchungen
- 86) Mathies, H., Schleifer, E. u. Liebrich, K. G.: Haptoglobinspiegeluntersuchungen bei Gesunden und Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Klin. Wschr. 41, 653 (1963)
- 87) Meyer, K.: Über Hämagglutininvermehrung und Hämagglutination fördernde Wirkung bei menschlichen Seren. Z. Immunforsch. 34, 229 (1922)

- 88) Micheli, A., Scheidegger, J. J., Fallet, G. H., Buzzi, C. et Spahr, J.: Etude du comportement euglobulinique des facteurs agglutinants dans la polyarthrite chronique évolutive et dans d'autres affections. Bull. Acad. Suisse Sci. Méd. 18, 16 (1962)
- 89) Miehle, K., Kruppa, K. H. u. Schimanski, J.: Die serologischen Reaktionen zum Nachweis des Rheumafaktors. Münch. med. Wschr. 102, 382 (1960)
- 90) Miehle, K. u. Puttnins, T.: Der serologische Nachweis des Rheumafaktors durch den Inhibitionstest. Z. Rheumaforsch. 18, 372 (1959)
- 91) Miehle, K. u. Schimanski, J.: Die Agglutinationsreaktion zur Bestimmung des Rheumafaktors und ihr Wert für die Diagnose der chronischen rheumatoiden Polyarthrititis. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 65, 368 (1959)
- 92) Milgrom, F. and Witebsky, E.: Studies on the rheumatoid and related serum factors. I. Autoimmunisation of rabbits with gamma globulin. J. Amer. med. Ass. 174, 56 (1960)
- 93) Müller, W.: Die Serologie der chronischen Polyarthrititis. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962
- 94) Müller, W. u. Haftstein, F.: Die quantitative Erfassung des "Rheumafaktors" durch Präzipitation des Serums mit Gammaglobulin im "Grenzschichtreaktiometer". Zschr. klin. Med. 156, 154 (1959)
- 95) Müller, W. u. Schupp, E.: Der Latex-Tropfentest (Rheumatoid-Arthritistest) und seine Bedeutung für die Diagnose und Differentialdiagnose chronisch rheumatischer Erkrankungen. Z. Rheumaforsch. 18, 378 (1959)
- 96) Müller, W., Wurm, K. u. Franz, G.: Das Vorkommen einer dem "Rheumafaktor" analogen Serums substanz bei Sarkoidose (Morbus Boeck). Beitr. Klin. Tuberk. 124, 462 (1961)
- 97) Müller-Eberhard, H. J.: Der Rheumafaktor. Dtsch. med. Wschr. 84, 719 (1959)
- 98) Müller-Eberhard, H. J.: Serum factors which interact with aggregated gamma globulin. Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo, Rom 3.-7. Sept. 1961
- 99) Müller-Eberhard, H. J., Kunkel, H. G. and Franklin, E. C.: Two types of γ -globulin differing in carbohydrate content. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 146 (1956)
- 100) Müller-Eberhard, H. J., Kunkel, H. G. u. Franklin, E. C.: Das Vorkommen eines ungewöhnlichen Gammaglobulinkomplexes im Serum Rheumakranker. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 63, 642 (1957)
- 101) Müller-Eberhard, H. J. and Nilsson, U.: Relation of a B_1 -glycoprotein of human serum to the complement system. J. exp. Med. 111, 217 (1960)
- 102) Müller-Eberhard, H. J., Nilsson, U. and Aronsson, T.: Isolation and characterization of two B_1 -glycoproteins of human serum. J. exp. Med. 111, 201 (1960)
- 103) Najjar, V. A. and Fisher, J.: Mechanism of antibody-antigen reaction. Science 122, 1272 (1955)

- 104) Najjar, V. A., Sidbury, J. E. and Fisher, J.: Further studies on the mechanism of antibody-antigen interaction. *Biochim. biophys. Acta* 26, 114 (1957)
- 105) Oker-Blom, N.: Serological studies in rheumatoid arthritis. I. A comparison between the agglutination of hemolytic streptococci and certain other bacteria by sera from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Med. Exper. Biol. Fenn.* 26, 77 (1948)
- 106) Oker-Blom, N.: Om agglutination av *Staphylococcus aureus* vid kronisks polyarthrit. *Nord. Med.* 41, 74 (1949)
- 107) Udenhertzen, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 2, 1 (1958)
- 108) Udenhertzen, O. and Jonsson, E.: *Nord. Med.* 42, 1449 (1949); zit. Müller-Eberhard, H. J.: (97)
- 109) Feltler, A. and Christian, C. L.: The presence of the "rheumatoid factor" in sera from patients with syphilis. *Arthritis Rheumatism* 2, 1 (1959)
- 110) Perlick, E.: Zur pathogenetischen Bedeutung der Serumkomplement-Aktivität bei Auto-Immunsensibilisationskrankheiten. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 68, 572 (1962)
- 111) Pike, R. M., Sulkin, S. E. and Coggeshall, H. C.: Serological reactions in rheumatoid arthritis. II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes. *J. Immun.* 63, 447 (1949)
- 112) Podliachon, L., Jaqueline, F. et Eyquem, A.: Le facteur sérique Gm^2 au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques. *Ann. Inst. Pasteur* 94, 590 (1958)
- 113) Mantz, L. A., Randall, E. and Ketner, D.: Electrophoretical study of serum factors responsible for serological reaction in rheumatoid arthritis with demonstration of two inhibitors. *Arthritis Rheumatism* 2, 104 (1959)
- 114) Rheine, M. E., McCoy, F. W., Buehler, E. V. and Burrell, R. G.: Effects of animal sera and serum albumin on latex fixation test for rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 96, 67 (1957)
- 115) Ropartz, G., Lenoir, J. and Rival, L.: A new inheritable property of human sera: the Inv factor. *Nature (London)* 189, 586 (1961)
- 116) Rose, M., Pagan, G., Pearce, E. and Lipman, M. O.: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 68, 1 (1948)
- 117) Scheidegger, J. J.: Une micro-méthode de l' immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955)
- 118) Scheidegger, J. J.: L' immuno-électrophorèse. *Sem. Hôp.* 32, 2119 (1956)
- 119) Schierz, G.: Zur serologischen Diagnose der primär chronischen Polyarthritide mit dem Hamagglutinations-Inhibitionstest. *Z. Rheumaforsch.* 21, 162 (1962)
- 120) Schmid, F. R. and Slatis, H.: Clinical and serological abnormalities in the families of patients with rheumatoid arthritis. *Atti del X. Congr. della Lega internat. contro il reumatismo, Rom* 2.-7.9.1961

- 121) Schubart, A. F.: Latex-fixation test in rheumatoid arthritis. II. Characterization of the thermolabile inhibitor by a serologic study. New England J. Med. 261, 579 (1959)
- 122) Schubart, A. F., Cohen, A. S. and Calkins, E.: Latex-fixation test in rheumatoid arthritis. I. Clinical significance of a thermolabile inhibitor. New England J. Med. 261, 365 (1959)
- 123) Seifert, H.: Untersuchungen zum Nachweis des hämagglutinierenden Faktors, des Streptokokken agglutinierenden Faktors und zweier Latex agglutinierender Faktoren im Rheumatikerserum. Z. Rheumaforsch. 21, 217 (1962)
- 124) Shichikawa, K., Gamamoto, T. et Fujioka, M.: Sur la production experimentale du facteur rhumatoïde. Atti del. X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo, Rom 3.-7.9.1961
- 125) Singer, J. M. and Plotz, C. M.: The latex fixation test, I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 21, 888 (1956)
- 126) Singer, J. M. and Plotz, C. M.: Slide latex fixation test. A simple screening method for the diagnosis of rheumatoid arthritis. J. Amer. Med. Ass. 168, 180 (1958)
- 127) Stein, L. and Wertheimer, E.: Nature 149, 528 (1942); zit.: Svartz, N. u. Schlossmann, K.: (136)
- 128) Svartz, N.: Serologische Diagnostik bei Kollagenkrankheiten. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 147 (1959)
- 129) Svartz, N.: The rheumatoid factor, its origin and nature. Acta med. Scand. 168, 285 (1960)
- 130) Svartz, N.: Der Rheumafaktor, seine Bedeutung und Eigenschaften. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 18, 1 (1962)
- 131) Svartz, N., Carlson, L. A., Schlossmann, K. and Ehrenberg, A.: Isolation of the rheumatoid factor. Acta med. Scand. 160, 87 (1958)
- 132) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: En ny serologisk reaktion vid kronisk polyarthrit. Nord. Med. Tskr. 42, 1390 (1949)
- 133) Svartz, N. and Schlossmann, K.: On substances agglutinating sheep erythrocytes obtained by fractionation of blood serum with carbon dioxide. Acta med. Scand. 145, 216 (1953)
- 134) Svartz, N. and Schlossmann, K.: Agglutination of sensitized sheep erythrocytes by cold precipitable serum substances in rheumatoid arthritis. Acta med. Scand. 146, 313 (1955)
- 135) Svartz, N. et Schlossmann, K.: Le facteur hémagglutinant dans le sang des malades souffrant d'arthrite rhumatoïde. Schweiz. med. Wschr. 83, 782 (1953)
- 136) Svartz, N. and Schlossmann, K.: A serum cold precipitable hemagglutinating factor in rheumatoid arthritis. Acta med. Scand. 149, 83 (1954)
- 137) Svartz, N. and Schlossmann, K.: Cold precipitable hemagglutinating factor in serum from patients with rheumatoid arthritis. Ann. rheum. Dis. 14, 191 (1955)
- 138) Taranta, A., Weiss, H. S. and Franklin, E.C.: Precipitating factor for aggregated γ -Globulins in normal human sera. Nature 189, 239 (1961)
- 139) Tuch, E.: Allergie und Rheumatismus. Acta allerg. 14, 203 (1959)

Lebenslauf

Am 10. Juni 1917 wurde ich in Gotha als Sohn des Arztes Dr. Alfred Asmus und seiner Frau Elisabeth, geb. Hartweg geboren und lebte seit 1918 in Hamburg, besuchte dort eine private Vorschule und später das Johanneum, das humanistische Gymnasium, an dem ich 1937 die Reifeprüfung ablegte. Nach zweieinhalbjähriger Arbeits- und Wehrdienstzeit machte ich den Krieg bei Frontpioniereinheiten mit. Die Frontdienstzeit wurde nach einer Verwundung durch das vorklinische Medizininstutium an der Universität Hamburg unterbrochen. Nach bestandener Physik wurde ich zum Dienst an Feld- und Kriegslazaretten an die Ostfront versetzt. Bei dem Zusammenbruch der Ostfront entkam ich nach Genesee, wo ich in englischer Gefangenschaft ein Kriegesgefangenensemester ableisten konnte. Nach Entlassung aus der Gefangenschaft im September 1945 setzte ich das Studium in Hamburg und später in Bonn fort, wo ich im Mai 1948 Staatsexamen und Promotion ablegte. Ab Juni 1948 war ich 13 Monate als Assistent- und Stationsarzt an der Lungenklinik des Stromberg-Hof und am Kreiskrankenhaus Hünern/Har und anschließend 1 Jahr und 8 Monate unbezahlt als Assistenzarzt an der Medizinischen Universitätsklinik Mainz tätig. Meine Krankenhaus- und Klinikarztzeit wollte ich wegen der damaligen Unmöglichkeit, eine bezahlte Stelle zu bekommen, durch Tätigkeiten in der Praxis und in wissenschaftlichen Abteilungen in der pharmazeutischen Industrie unterbrechen, was ich von Dezember 1950 bis März 1956 in der pharm. Klinik Zünnen und ab 1. April 1956 vorübergehend unbezahlt und später in bezahlter Stelle als wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik München arbeiten konnte und dort im Mai 1957 meine Facharztanerkennung für innere Krankheiten erhielt. Ich beschäftigte mich vorwiegend mit der Pneumologie und baute eine Pneumatiker Ambulanz und ein pneumostologisches Laboratorium auf. Ein auf Grund meiner wissenschaftlichen Arbeiten über den Wirkungsmechanismus der hyperosmotischhemmenden Wirkung antirheumatischer Substanzen gewonnenes Stipendium setzte ich zu einem viermonatigen Studienaufenthalt in den Vereinigten Staaten an rheumatologisches Abteilungen bzw. Kliniken in Chicago, Boston, Philadelphia und Bethesda.

